

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KATSUJI INOUE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIDZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; HAZIME MASAMUNE, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUJI SUYEYOSHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Taihoku; SENJI UCHINO, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

QP
501
J67

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

Reprinted by

TOA BOOK EXPORTS, INC.

Tokyo Kosho Kaikan Building
Kanda Ogawa-cho 3-22, Tokyo
CABLE: Toaperiodical, Tokyo
PHONE: Tokyo 291-1448

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KATSUJI INOUE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIDZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; HAZIME MASAMUNE, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUUJI SUYEYOSHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Taihoku; SENJI UCHINO, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

VOLUME 26

TOKYO

1937

COPYRIGHT 1937

BY

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

PUBLISHED BY THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

CONTENTS TO VOLUME 26.

	Page
MIYAZAKI, Masaki. A contribution to the fat metabolism. The second report. Experimental studies on the influence of various kinds of nutrition upon the acetone forming function	1
The third report. Experimental studies on the acetone forming function of the liver damaged with various methods	19
ITZIOKA, Fuyutaroo. Über die proteolytischen Fermente der Pankreasdrüse des Kaninchens. II. Mitteilung: Über die Aktivierung des Sekrettrypsinogens des Kaninchens	37
YOSHIO, Keizo. Über den Einfluss der Ernährung auf die Wirkung des Adrenalins. II. Mitteilung	49
TSURU, Nagao. Über die Vorgänge der Acetonkörperbildung in der Magenwand. II. Mitteilung. Bei Hunger. III. Mitteilung. Kreuzversuch	63
ITZIOKA, Fuyutaroo. Über den Einfluss der Galle auf die Pankreas- und die Dünndarmproteolyse	75
ITZIOKA, Fuyutaroo. Über die proteolytischen Fermente der Pankreasdrüse, deren Ausführungsgänge unterbunden worden sind	81
Leont'ev, I. and K. Markov. Chemical and immunological studies on muscle proteins of some invertebrates	87
MORI, Chuzo. Über die Bedeutung der Schilddrüse bei Urikolyse	97
MORI, Chuzo. Über die Bedeutung der Schilddrüse im Zucker- und Fettstoffwechsel	107
AKASI, Syûzo. Verhalten des Octopins und seiner Isomere gegen Arginase	129
HASHIMOTO, Kikuma. Über Hydrolyse des α - und β -Glycerophosphates	137
KOTAKE, Y. (jr.) und N. ITÔ. Studies über den intermediären Stoffwechsel des Tryptophans	161
SHÔJI, Tadashi. Studies on the changes in the physiological condition of the new born infant. V. On the synthesis of indican	167
SHIMADA, Toshio. Beiträge zur Kenntnis der Gallensäuren von Fischgalle. Maguro-Fisch (<i>Thynnus thynnus</i>) und Ishinagi-Fisch (<i>Stereolepis ishinagi</i>)	181
ITO, Ryoji and NAKAMURA, Takeo. Studies on Lipase. IV. Effects of reduction and oxidation on the reversible action of pancreatic lipase and pro-lipase	187
IMAIZUMI, Mitsumasa. Über den Abbau der <i>d</i> -Glukosaminsäure durch Mikroorganismen und im Tierorganismus	197
YASUDA, Morio. Lipids analysis of the human brain	203
KIYOHARA, Kan-iti und IZAWA, Shozô. Über die Einfluss des Schwangerenharns, des Extraktes der Plazenta, des Prolans, des Serums des schwangeren Kaninchens und der Emulsion der Hypophyse auf Oxydasereaktion des Ovariums, des Uterus und einiger anderer Organe ...	211
MASAMUNE, Hajime and NAGAZUMI, Yoshio. Colorimetric analysis	

of aminosugars in protein hydrolysates on the principle of Elson and Morgan	223
OZAKI, Genei. On the so-called mucoitinsulfuric acid (P. A. Levene) from gastric mucosa	233
OZAKI, Genei. Glycoproteins from gastric mucosa	239
SAITO, Koichiro and SHUEH, Chin Kai. On the influence of urethane anaesthesia upon the gaseous content of the blood. (Blood gas studies performed with a new micro blood gas apparatus. III)	247
MORIMOTO, Kazuyoshi. Über die Phenolsulfatase	259
HAYASHI, Hatiro u. IWASAKI, Takeshi. Über die Extraktivstoffe aus Krötenmuskel in der Leichzeit	275
SODA, Katsuya and HEIMA, Takashi. Über die Hippursäure in der Ascitesflüssigkeit	281
SODA, Katsuya. Beiträge zum Studium der Milzfunktion.	
I. Über den Stoffwechsel der stickstoffhaltigen Substanzen in der Milz	285
II. Über die Harnsäurebildung in der Milz	297
III. Über die Aminosäurebildung in der Milz	307
FUKUI, Tomoyasu und ISHIDA, Sukio. Über das Schicksal der Dehydrocholsäure im Kaninchenorganismus	319
ABE, Yosimi. The colorimetric micromethod of quantitative determination of desoxycholic and cholic acid in blood	323
KIMURA, Toshizo. Über die Gallensäure der Känguru-(<i>Macropus giganteus</i>) und Leopardengalle (<i>Felis Leopardus</i>)	327
MIYAZI, Shigeki. Beiträge zur Kenntnis der Cholansäure	333
MIYAZI, Shigeki u. KIMURA, Toshio. Über das Vorkommen der Cholsäure und gepaarter sowie ungepaarter Chenodesoxycholsäure in Mugilgalle	337
SADAMITSU, Rizo. Über die Dephosphorierung des Caseins durch die Phosphatase	341
HISAMURA, Humio. Biochemical studies on carbohydrates. XXIX. A few supplementary notes on the estimation of nonamino-sugars by the Dische, Tillmans, and Philippi methods	359
KITAGAWA, Matsunosuke and TSUKAMOTO, Jiro. Studies on diamino acid, canavanin. VI. The formation of desamino canavanin from canavanin	373
IWABUCHI, Takeo. Studien über die Arginase, II	387
YOSII, Syunitirô. Beiträge zur Kenntnis der Fettsäureoxydation im Tierkörper. A. Über die Dehydrogenase von höheren Fettsäuren	397
ISHIHARA, Tokuharu. Beiträge zur Kenntnis der Pentosurie bei experimentellem Stauungsikterus	425
IMAIZUMI, Mitizimasa. Über das Verhalten des Kupfers und Eisens bei der Bebrütung der Hühnereier	433
UTZINO, S., S. TSUNOO und T. MORI. Über die Acylasewirkung. I. Mitteilung. Über das Verhalten des Pyridylglycins und der Derivate des Phenylpropionylglycins gegenüber Acylasewirkung verschiedener	

Contents

v

Herkunft	439
II. Mitteilung. Über das Verhalten der Derivate der Furoyl- und Furfurpropionylglyceins gegenüber Acylasewirkung verschiedener Herkunft	449
SHOJI, Tadashi. Studies on the changes in the physiological condition of the new-born infant. Report VI. On the carbohydrate metabolism ...	459
UTZINO, S., S. TSUNOO, T. MORI und S. FUJITA. Über die Acylasewirkung. III. Mitteilung. Über das Verhalten des Furoylisoserins und der Phenylhippursäure gegenüber Acylasewirkung verschiedener Herkunft	477
UTZINO, S., S. TSUNOO und S. FUJITA. Über die Acylasewirkung. IV. Mitteilung. Über das Verhalten der Acyl-aminooxypropansulfonsäure gegenüber Acylasewirkung	483



Digitized by the Internet Archive
in 2024

A CONTRIBUTION TO THE FAT METABOLISM.

The second report.

Experimental studies on the influence of various kinds of nutrition upon the acetone forming function.

By

MASAKI MIYAZAKI.

(From the Medical Clinic of Prof. N. Kageura,
Nagasaki Medical College, Japan.)

(Received for publication, December 10, 1936)

In the previous paper I have reported that a high-fat diet causes a fat deposition and glycogen decrease in the liver, which are followed by a lowering of the glycogenetic function of the organ, but these effects of a high-fat diet upon the liver can be paralysed by the addition of carbohydrate to the same diet. In relation to these facts the questions of the influence of a high-fat diet upon the acetone formation in the organism are not only interesting from the point of view of science but important from the standpoint of medical practice. It is well known that the excessive formation of acetone bodies in the organism usually causes severe symptoms such as dyspnoea, coma, etc. This phenomenon is known as ketosis and we see its classical example in the course of serious diabetes. According to present day views the acetone bodies are formed chiefly from fatty acids with an even number of carbon atoms (Magnus-Levy 1899, Schwarz 1900, Knoop 1904, Emden 1907, etc.) mainly in the liver (Emden and Kalberah 1906, Fischler and Kossow 1913, etc.). Among the fatty acids with an even number of carbon atoms the lower fatty acids have a very powerful ketogenic effect (Noorden and Isaac). Of the lower fatty acids with an even number of carbon atoms butyric acid which has 4 carbon atoms is most similar, in its chemical

This article was reported in the thirty-fourth annual meeting of the Japanese Society of Internal Medicine (held at Tokyo, Japan, April 1-3, 1937).

formula, to the acetone bodies. In these respects, I have investigated the influence of a high-fat diet and further of fasting upon the acetone forming function of the liver from butyric acid, under consideration of the fat or glycogen content in the organ, to make some contribution to the studies of ketone, viz., fat metabolism. The results are reported in the present paper.

NOTE ON METHODS.

As in the previous experiments on fat-carbohydrate metabolism, full-grown healthy dogs were employed also in these experiments. The acetone forming function was investigated as follows. The isolated liver of dogs killed by bleeding was perfused for an hour with defibrinated blood (obtained from the same dogs) employing the Yamakawa-Mizuki apparatus. In a control series of experiments no fatty acid was added to the perfusion fluid. In a main series of experiments, 1 g butyric acid which was neutralised with sodium carbonate was added to the perfusion fluid. The acetone bodies were determined by means of the Takahata-Kume method. The amount of the total acetone (X) which is formed per 100 g liver was calculated according to the following formula.

$$X = \frac{(a-b)B}{L}$$

a: value (mg%) for total acetone in the blood after perfusing.

b: value (mg%) for total acetone in the blood before perfusing.

B: quantity (in 100 cc. unit) of perfusion fluid.

L: weight (in 100 g unit) of liver used for perfusing.

When the animals were killed their urine was examined by the Legal and Gerhardt reaction.

I. BLANK INVESTIGATION WITHOUT THE LIVER.

According to Grégoire (1913), the erythrocyte has an acetone forming and an acetone decomposing function. So I have performed the through-blooding investigation without the liver at first. The results are shown in Table I. I will not add many

TABLE I.
Blank investigation.

Date	No. Sex	B. W. (kg)	Condition	Blood (cc.)	Acet. (mg%)		Acetoa. acid (mg%)	β -hydroxyb. acid (mg%)	Total acet. (mg%)	Incr. or decr. of total acet. (mg%)
5/VIII	45 ♂	8.1	no added	300	Bef.	0.6	5.5	6.6	7.3	0
					Aft.	1.0	6.9	4.4	7.3	
7/VIII	46 ♂	9.5	„	350	Bef.	1.4	8.8	4.4	8.8	-0.2
					Aft.	1.3	8.0	5.8	9.0	
			(average)							-0.1
10/VIII	47 ♀	9.4	lg. butyr. acid added	350	Bef.	1.0	5.8	6.2	7.6	+0.6
					Aft.	1.3	6.9	5.4	8.2	
14/VIII	48 ♂	8.5	„	300	Bef.	2.5	6.6	3.3	8.0	+1.1
					Aft.	2.5	5.5	2.5	6.9	
			(average)							-0.5

words to this table. We see immediately that the difference of the amount of the total acetone in the perfusion fluid before and after the perfusing is negligibly small in the control series and also in the main series of experiments.

II. THE INFLUENCE OF HIGH-FAT DIET UPON THE ACETONE FORMING FUNCTION OF THE LIVER FROM BUTYRIC ACID.

It is well known that in human subjects a carbohydrate-free high-fat diet causes a more or less marked ketosis. This is well expressed by the words "Fat burns in the flame of carbohydrate, but without it, it smokes." Many animal experimenters, however, were unable to provoke a marked ketosis in dogs by a high-fat diet (Geelmuyden 1897, Kageura 1922, Allen 1923, Aoki 1926, etc.). According to Kageura's experiments on dogs, the acetone content in the blood is only slightly increased, or not increased at all by a high-fat diet. In relation to this fact a fundamentally important question is to know how the acetone forming function

of the liver is influenced by a carbohydrate-free high-fat diet. To make this point clear the acetone forming function of the liver from butyric acid was investigated comparatively on dogs nourished with a normal mixed diet for five days and other dogs nourished with a high-fat diet for the same five days. The composition of the diets is described in the first report. The dogs were killed about 24 hours after the last meal. The Legal and Gerhardt reaction in the urine were always negative.

Results.

The results are shown in Tables II and III. In the control series of experiments the content of the total acetone in the perfusion fluid is slightly decreased after the perfusing and no marked difference can be recognized in both groups of dogs. In the main series of experiments the content of the total acetone in the perfusion fluid is more or less increased after the perfusing, but the amount of the total acetone increased per 100 g liver shows no remarkable difference between the dogs nourished with a normal mixed diet and those with a high-fat diet. These results indicate that as far as the butyric acid is concerned, the acetone forming function of the liver is not increased by a high-fat diet. Although the glycogen content and the glycogenetic function of the liver were not parallelly investigated in these experiments, from the results of my previous experiments there will be no doubt that the glycogen content of the liver is larger in the dogs nourished with a normal mixed diet than in those with a high-fat diet and the glycogenetic function of the organ is much stronger in the former than in the latter. Hence we may say at least that the glycogen content and the glycogenetic function of the liver are more sensitively influenced by a high-fat diet than the acetone forming function of the organ from butyric acid.

III. THE INFLUENCE OF FASTING UPON THE ACETONE FORMING FUNCTION OF THE LIVER FROM BUTYRIC ACID.

It is well known that in human subjects a more or less marked kesotism develops during fasting. Many animal experimenters,

TABLE II.
Investigation on dogs nourished with normal mixed diet.

Date	No. Sex	B. W. (kg)	Condition	Liver (g)	Blood (cc.)	Acet. (mg%)	Acetac. acid (mg%)	β -hydroxyb. acid (mg%)	Total acet. (mg%)	Incr. or decr. of T. A. per 100 g. liver (mg)
25/XI	49 ♂	9.5	no added	345	300	Bef. Aft.	2.9 2.2	6.7 3.3	6.3 3.6	— - 2.3
27/XI	50 ♂	11.2	"	420	400	Bef. Aft.	6.9 5.5	6.6 4.5	9.8 6.2	— - 3.4
			(average)							- 2.8
23/XII	51 ♂	8.2	lg. butyr. acid added	250	300	Bef. Aft.	5.6 13.9	4.5 20.2	8.5 24.6	+ 19.3
26/XII	52 ♂	9.2	"	290	300	Bef. Aft.	6.9 15.4	5.8 10.0	7.6 14.5	+ 7.1
27/XII	53 ♂	9.6	"	339	350	Bef. Aft.	5.8 7.3	7.5 10.8	10.3 12.8	+ 2.5
11/I	54 ♂	10.2	"	395	400	Bef. Aft.	9.5 7.0	8.6 12.5	10.6 21.2	+ 10.7
			(average)							+ 9.9

TABLE III.
Investigation on dogs nourished with high-fat diet.

Date	No. Sex	B. W. (kg)	Condition	Liver (g)	Blood (cc.)	Acet. (mg%)	Acetosa. acid (mg%)	β -hydroxyb. acid (mg%)	Total acet. (mg%)	Incr. or decr. off A. per 100 gm liver (mg)
3/XII	55 ♂	11.6	no added	405	400	Bef. 1.8 Aft. 1.9	8.8 7.7	7.2 4.4	10.8 8.6	- 2.1
21/XII	56 ♂	9.8	"	325	300	Bef. 1.4 Aft. 0.3	6.6 4.4	2.1 1.6	6.2 3.6	- 2.4
			(average)							- 2.2
16/I	57 ♂	10.8	lg. butyr. acid adde	401	400	Bef. 1.8 Aft. 2.3	2.2 9.5	3.3 18.3	4.8 17.9	+ 13.0
25/I	58 ♂	11.0	"	284	300	Bef. 2.5 Aft. 2.7	5.8 13.6	8.3 19.1	10.3 21.0	+ 11.2
27/I	59 ♂	11.9	"	319	350	Bef. 4.2 Aft. 5.4	8.0 9.1	6.0 22.2	12.0 22.8	+ 11.8
30/I	60 ♀	8.9	"	256	300	Bef. 2.3 Aft. 1.2	5.5 6.9	6.6 17.0	9.0 14.5	+ 6.2
			(average)							+ 10.5

however, were unable to bring about a marked ketosis in dogs by fasting (Geelmuyden 1897, Waldvogel 1899, Allen 1923, Terroine, Émile and Trimbach 1931, etc.). Relating to this fact Embden and his co-worker (1908) have already shown that when dogs' liver is perfused with ox blood, acetone—mainly acetoacetic acid—is formed and in that case fasting has no influence upon the acetone formation in the liver. According to Murakami (1934), the acetone amount in the blood or urine is decreased in fasting rabbits and in that case the acetone forming function of the liver from butyric acid is lowered, although the liver glycogen is perfectly vanished. According to Tsuru (1935), who first found that the acetone bodies are formed also in the stomach wall of normal dogs from fatty acids with an even number of carbon atoms, the stomach wall of fasting dogs has no acetone forming function from the fatty acids. From the results obtained by the earlier experimenters above mentioned and from my previous experiments on dogs nourished with a high-fat diet, it will be easily supposed that the acetone forming function of the liver of fasting dogs from butyric acid will not be markedly increased, even if it is increased. On this point, however, there is no experimental evidence. So I have investigated the acetone forming function of the liver from butyric acid on dogs of various periods of fasting. In 3 cases of dogs which had fasted for 3 weeks, the glycogen and the fat content of the liver were parallelly determined with the object to know their relation to the acetone forming function of the liver. In these cases one lobe of the liver is cut off before perfusing, therefore the liver weight indicated in the table is smaller than the weight of the total liver. The Legal and Gerhardt reaction in the urine were always negative.

Results.

The results are shown in Tables IV a, IV b and IV c. In the control series of experiments the amount of the total acetone in the perfusion fluid is slightly decreased after the perfusing and no marked difference can be recognized in each period of fasting. In the control series of experiments the amount of the total acetone

TABLE IV a.
Investigation on 1 week fasting dogs.

Date	No. Sex	B.W. (kg)	Condition	Liver (g)	Blood (cc)	Acet. (mg%)		Acetoa. acid (mg%)	β -hydroxyb. acid (mg%)	Total acet. (mg%)	Incr. or decr. of T.A. per 100 g. liver (mg)
13/IV	61 ♂	11.5	no added	261	350	Bef.	2.0	9.5	5.8	10.6	
14/IV	62 ♂	8.9	"	289	370	Aft.	2.3	6.6	4.2	8.3	-3.0
						Bef.	5.1	6.9	6.2	12.4	
						Aft.	4.4	4.7	5.4	10.0	-3.0
			(average)								-3.0
16/IV	63 ♂	10.1	1 g butyr. acid added	246	300	Bef.	2.0	6.6	4.1	7.9	
21/IV	64 ♂	8.3	"	259	340	Aft.	1.0	10.2	8.3	11.4	+4.2
						Bef.	3.4	9.5	7.5	12.9	
2/V	65 ♂	8.0	"	317	350	Aft.	3.7	19.8	15.0	23.2	+13.5
						Bef.	3.0	5.8	6.6	9.8	
4/V	66 ♂	10.9	"	298	400	Aft.	9.5	18.3	17.5	29.6	+21.8
						Bef.	1.3	5.5	6.6	9.6	+15.4
						Aft.	4.7	11.7	14.5	19.3	+13.7
			(average)								

TABLE IV b.
Investigation on 2 weeks fasting dogs.

Date	No. Sex	B.W. (kg)	Condition	Liver (g)	Blood (cc)	Acet. (mg%)	Acetoa. acid (mg%)	β -hydroxyb. acid (mg%)	Total acet. (mg%)	Incr. or decr. of T.A. per 100 g. liver (mg)
11/V	67 ♂	9.2	no added	310	380	Bef.	6.6	5.4	8.0	
12/V	68 ♂	9.5	"	275	370	Aft.	8.0	4.1	7.0	-1.2
						Bef.	5.1	8.3	10.2	
						Aft.	4.4	6.2	6.9	-4.4
			(average)							-2.8
27/V	69 ♂	12.5	1 g. butyr. acid added	351	400	Bef.	5.5	6.6	9.6	
29/V	70 ♂	10.0	"	306	350	Aft.	4.0	20.4	14.8	+5.9
						Bef.	7.3	5.0	8.1	
3/VI	71 ♂	10.4	"	328	400	Aft.	14.6	12.5	18.2	+11.5
						Bef.	7.3	7.5	10.9	
8/VI	72 ♂	9.2	"	277	300	Aft.	16.5	8.7	21.6	+13.0
						Bef.	8.4	5.8	8.9	
						Aft.	12.5	7.0	19.6	+11.5
			(average)							+10.4

TABLE IV c.
Investigation on 3 weeks fasting dogs.

Date	No. Sex	B.W. (kg)	Condition	Liver			Blood (cc)	Acet. (mg%)	Acetoea. acid (mg%)	β -hydroxyb. acid (mg%)	Total acet. (mg%)	Iner. or decr. of T.A. per 100 g. liver (mg)
				Weg. (g)	Glyc. (%)	Fat (%)						
10/VI	73 ♂	9.5	no added	295			300	Bef. 1.0 Aft. 1.3	5.5 4.0	5.0 3.3	6.8 5.3	-1.9
15/VI	74 ♂	10.2	"	281			370	Bef. 2.7 Aft. 1.0	8.4 7.3	7.5 8.3	11.5 9.7	-2.3
			(average)									-2.1
18/VI	75 ♂	10.5	1 g. butyr. acid added	298			300	Bef. 1.0 Aft. 2.3	6.6 4.0	6.2 8.3	8.1 9.1	+1.0
30/VI	76 ♂	15.0	"	319	0.61	2.97	400	Bef. 0.1 Aft. 0.3	4.0 4.4	2.9 5.8	4.0 5.8	+2.2
5/IX	77 ♂	11.5	"	285	0.44	2.89	350	Bef. 0.6 Aft. 1.0	5.8 15.4	7.4 12.5	7.9 16.6	+9.7
15/IX	78 ♂	10.0	"	252	0.70	2.21	300	Bef. 2.5 Aft. 1.8	2.2 9.1	4.1 5.8	5.9 10.1	+5.0
			(average)		0.58	2.69						+4.4

in the perfusion fluid is found to be increased after the perfusing. The increase of the total acetone per 100 g liver in one week fasting is somewhat larger than that in a normal mixed diet. The increase of the total acetone per 100 g liver in two weeks fasting is nearly the same with that in a normal mixed diet. The increase of the total acetone per 100 g liver in three weeks fasting is distinctly smaller than that in a normal mixed diet. This result indicates that fasting of long duration lowers the acetone forming function of the liver from butyric acid. In this case the glycogen and the fat content in the liver seems not to have any direct relation to the acetone forming function, because the glycogen content in the liver is nearly the same with the value obtained in dogs nourished with a high-fat diet and the fat content in the organ is nearly the same with the value obtained in dogs nourished with a normal mixed diet.

IV. THE INFLUENCE OF THE GLYCOGEN CONTENT IN THE LIVER UPON THE ACETONE FORMING FUNCTION OF IT FROM BUTYRIC ACID.

It is universally believed that the acetone formation in the liver is governed by the glycogen content in it, in other words, acetone formation is much larger in the liver, poor in glycogen than in that rich in glycogen. According to Mochizuki (1913), however, a large amount of acetone bodies is formed also in the liver rich in glycogen, from butyric acid. From the results of Murakami's (1934) and my own experiments on fasting animals, there is no doubt that there is a case in which the acetone forming function from butyric acid is distinctly lowered in glycogen-poor liver. Considering this fact and Mochizuki's statement above mentioned, it is of great interest to compare the acetone forming function of the liver from butyric acid on two groups of dogs in which the difference of glycogen content in the liver is very large. So I have performed the following experiments. In order to obtain a glycogen-rich liver, one group of dogs was fed for 3 days with a large amount (as much as they were able to eat) of boiled rice to which a small amount of beef was added. The

dogs were killed 6 hours after the last meal for the perfusing, because the glycogen content in the liver shows the highest value at the 6th hour after carbohydrate intake (Matsui 1926, Inutsuka 1934). In order to obtain a glycogen-poor liver, another group of dogs was kept fasting for 7 days and the last 3 days phloridzine (0.2 g per kilo, per day) was injected subcutaneously and 7 hours after the last injection the animals were killed for the perfusing, because the glycogen content in the liver shows the lowest value at the 7th hour after phloridzine injection (Junkersdorf 1922). 1 g phloridzine was dissolved in 10 cc. of 10% sodium carbonate solution. In the main series of experiments the glycogen and the fat content in the liver were parallelly determined. In dogs No. 86, 89 and 90 the Legal and Gerhardt reaction in the urine were positive. In the other dogs the reactions were negative.

RESULTS.

The results are shown in Tables V and VI. In the control series of experiments the amount of the total acetone in the perfusion fluid is found to be slightly decreased after the perfusing in the case of carbohydrate sated dogs and also in the case of phloridzined hungry dogs, although in the latter case the liver contains generally a large amount of fat, which is considered as a main source of acetone bodies. In the main series of experiments the amount of the total acetone in the perfusion fluid is found to be increased after the perfusing in both cases, with the exception of dog No. 82. The increase of the total acetone per 100 g liver is distinctly larger in the case of phloridzined hungry dogs than in that of carbohydrate sated dogs. This result indicates that the acetone forming function of the liver from butyric acid is probably related to its glycogen content to some extent. Strange to say, however, the value obtained in the phloridzined hungry dogs is not larger—even when the Legal and Gerhardt reaction in the urine were positive—than the value obtained in dogs nourished with a normal mixed diet. The results here obtained are very interesting in comparison with those obtained by Embden and Lattes (1908). According to them, when the liver of the

TABLE V.
Investigation on carbohydrate sated dogs.

Date	No. Sex	B.W. (kg)	Condition	Liver			Blood (cc)	Acet. (mg%)	Acetoo. acid (mg%)	β -hydroxyb. acid (mg%)	Total acet. (mg%)	Incr. or decr. of T.A. per 100 g. liver (mg)
				Weig. (g)	Gluc. (%)	Fat (%)						
18/VI	79 ♂	12.3	no added	349			380	Bef. 1.3 Aft. 1.5	3.6 2.5	5.0 3.3	6.0 4.7	-1.4
19/VI	80 ♂	9.8	"	317			400	Bef. 0.5 Aft. 0.5	6.6 2.9	3.6 4.5	6.2 4.6	-2.0
			(average)									-1.7
26/VI	81 ♀	11.1	1 g. butyr. acid added	421	7.93	1.45	400	Bef. 2.5 Aft. 1.0	5.8 6.6	6.2 8.3	9.1 9.3	+0.1
2/VII	82 ♂	9.7	"	312	6.87	1.51	350	Bef. 2.3 Aft. 1.3	6.6 5.5	6.0 8.8	9.3 9.2	-0.1
6/VII	83 ♂	10.1	"	242	5.50	1.68	350	Bef. 2.7 Aft. 3.4	4.0 7.7	3.3 10.4	6.7 13.5	+9.8
8/VII	84 ♀	10.0	"	270	5.68	1.81	300	Bef. 1.3 Aft. 3.7	8.0 15.4	7.7 2.5	10.0 13.7	+4.1
			(average)		6.50	1.61						+3.4

TABLE VI.
Investigation on phloridized hungry dogs.

Date	No. Sex	B.W. (kg)	Condition	Liver		Blood (cc)	Acet. (mg%)	Acetoa. acid (mg%)	β -hydroxyb. acid (mg%)	Total acet. (mg%)	Incr. or decr. of T.A. per 100 g. liver (mg)
				Weig. (g)	Glyc. (%)	Fat (%)					
21/VI	85 ♂	11.0	no added	368				350 Bef. 4.4	6.8	4.5	10.5
								Aft. 5.1	6.2	2.1	9.7
22/VI	26 ♂	9.8	"	280				300 Bef. 2.3	8.0	8.3	11.4
								Aft. 1.8	9.1	4.5	9.4
			(average)								-1.4
24/VI	87 ♂	9.1	1 g. butyr. acid added	268	0.14	8.71		300 Bef. 3.0	8.0	7.5	11.6
								Aft. 3.4	11.0	10.0	15.1
17/VII	88 ♂	8.5	"	287	0.34	5.42		400 Bef. 3.4	4.4	3.6	7.9
								Aft. 8.5	2.8	14.5	17.0
24/VII	89 ♀	11.1	"	283	0.25	8.55		400 Bef. 7.1	11.7	9.1	18.7
								Aft. 7.5	8.8	14.5	20.5
30/VII	90 ♂	8.4	"	223	0.05	13.55		250 Bef. 5.1	8.4	7.6	14.0
								Aft. 7.6	12.4	8.3	19.2
			(average)		0.20	9.06					+6.2

phloridzined hungry dogs is perfused with ox blood (1600 cc.) a much larger amount of acetone bodies is formed than in the normal liver. In their experiments the phloridzine dose (0.12-0.24 g per one dog, per day) is much smaller than in my case, although the duration of the administration (4-7 days) is longer than in my case. The difference in my result will probably be due to the difference of experimental method.

GENERAL DISCUSSION.

In the control series of my experiments it was shown that when the liver is perfused with the blood, the acetone content in the blood shows a decrease, although it is slight. This decrease in the perfusion fluid is generally considered as a result of the decomposition by the liver. Snapper and Grünbaum (1927), however, offered a serious objection against this opinion. According to them, the acetone bodies vanished from the perfusion fluid are found to be absorbed by the liver. On this point my result gives no conclusion. In my experiments on dogs nourished with a high-fat diet or fasting, it was shown that a high-fat diet or fasting does not cause a marked raising of the acetone forming function of the liver from butyric acid. This result is in agreement with the fact that a high-fat diet or fasting in dogs does not produce a remarkable ketosis. In the experiments on phloridzined hungry dogs with acetonuria, I had expected a very increased formation of acetone bodies in the liver from butyric acid, but I could not prove it. Embden and Lattes (1908) have shown that the formation of acetone bodies in the phloridzine-diabetic liver is much larger than in the normal liver and they explained the phloridzine-diabetic ketosis by the increased formation of acetone bodies in the liver. But my result is against their opinion. Recently many results which show the importance of the extrahepatic factors in the ketone metabolism have been accumulated by clinicians and also by animal experimenters. Winker (1932) has reported a marked ketonuria which was observed in a patient of encephalitis lethargica. In this case liver damage was excluded; the assimilative faculty for carbohydrate was normal. The ketonuria was not

recovered by a carbohydrate intake. From these observations he has concluded the existence of cerebral ketonuria. A similar observation has been made by Bix (1932). Gottschalk and Springbom (1931) have reported a marked acetoneuria in a patient of renal glycosuria. The acetoneuria was not recovered by a sufficient supply of carbohydrate. On the basis of clinical investigations Brentano (1933) has asserted that the ketone metabolism is chiefly regulated by the periphery, that is, "Ketonkörperbeseitigung" which takes place chiefly in the muscle and it is disturbed when the muscle glycogen is decomposed. Allen and Albert (1924) have reported that a marked ketonuria is observed also in phloridzined hungry dogs with Eck's fistula and they asserted the existence of an extrahepatic ketone formation. Watanabe (1927) has observed that the acetone formation in rabbits with hepatic damage shows no remarkable difference when compared with control animals and he has considered the existence of extrahepatic factors in the ketone metabolism. Considering these results of other authors, there seems to be no doubt that extrahepatic factors play an important role in the ketone metabolism. The result of my experiments on phloridzined hungry dogs also seems to suggest the importance of extrahepatic factors in the ketone metabolism.

SUMMARY.

By experiments on dogs the following results have been obtained.

1. A high-fat diet has no remarkable influence upon the acetone forming function of the liver from butyric acid.
2. 1-2 weeks fasting has no marked influence upon the acetone forming function of the liver from butyric acid.
3. 3 weeks fasting lowers the acetone forming function of the liver from butyric acid.
4. The acetone forming function of the liver from butyric acid has a relation to its glycogen content to some extent.
5. The important role of extrahepatic factors is not negligible in the acetone metabolism.

I wish to express my gratitude to Prof. N. Kageura for

suggesting this study and his guidance throughout the course of my research. My thanks are due to Dr. Sendju also for his help and advice.

REFERENCES.

- Aoki, S. (1926): *Folia endocrinologica japonica*, **1**, 1015.
 Allen, F. M. (1923): Cited after *Kongresszentralbl. f. d. ges. inn. Med.* (1924), **36**, 449.
 Allen, F. M. and Albert, H. F. (1924): cited after *Journ. of Gastroenterology* (1936), **11**, 1430.
 Bix, H. (1932): *Wien. kl. Wochenschr.*, **1**, 686.
 Brentano, C. (1933): *Zeitschr. f. kl. Med.*, **124**, 237.
 Embden, G. (1907): *Verhand. Kongr. inn. Med.*, **18**, 480.
 Embden, G. and Kalberlah, F. (1906): *Hofm. Beitr.*, **8**, 121.
 Embden, G. and Lattes, L. (1908): *Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.*, **11**, 327.
 Fischler, F. and Kossow, H. (1913): *Dtsch. Arch. f. kl. Med.*, **111**, 479.
 Grégoire, P. E. (1933): cited after *Berichte über d. ges. Physiol u. exp. Pharm.* (1934), **77**, 622.
 Geelmuyden, H. C. (1897): *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **23**, 431.
 Gottschalk, A. and Springbom, A. (1931): *kl. Wochenschr.*, **1**, 1208.
 Inutsuka, M. (1934): *Journ. of Biochem.*, **19**, 217.
 Junkersdorf, P. (1922): *Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol.*, **197**, 500.
 Kageura, N. (1922): *Journ. of Biochem.*, **2**, 341.
 Knoop, F. (1904): *Beitr. chem. Physiol. Pathol.*, **6**, 150.
 Mochizuki, J. (1913): *Bioch. Zeitschr.*, **55**, 446.
 Matsui, K. (1926): *Nagasaki Igakkwai Zassi*, **4**, 711.
 Murakami, H. (1934): *Journ. of Gastroenterology*, **9**, 546.
 Magnus-Levy, A. (1899): *Arch. exp. Pathol. Pharm.*, **42**, 146.
 Noorden, C. and Isaac, S. (1927): *Die Zuckerkrankheit und ihre Behandlung*, 8. Aufl., 180.
 Schwarz, L. (1900): *Verhand. Kongr. inn. Med.*, **18**, 480.
 Snapper, I. and Grünbaum, A. (1927): *Bioch. Zeitschr.*, **181**, 418.
 Tsuru, N. (1935): *Journ. of Biochem.*, **21**, 259.
 Terroine, E. F., Émile, F. and Trimbach, H. (1931): cited after *Kongresszentralbl. f. d. ges. inn. Med.* (1932), **66**, 770.
 Watanabe, K. (1927): *Aichi Igakkwai Zassi*, **35**, 38.
 Waldvogel, K. (1899): *Zeitschr. f. kl. Med.*, **38**, 506.
 Winker, W. (1932): *Zeitschr. f. kl. Med.*, **122**, 466.

A CONTRIBUTION TO THE FAT METABOLISM.

The third report.

Experimental studies on the acetone forming function of the liver damaged by various methods.*

By

MASAKI MIYAZAKI.

(From the Medical Clinic of Prof. N. Kageura,
Nagasaki Medical College, Japan.)

(Received for December 10, 1936)

In the previous paper I have reported that in dogs the acetone forming function of the liver from butyric acid is not markedly influenced by a high-fat diet or 1-2 weeks fasting, but it is lowered by 3 weeks fasting i.e., fasting of long duration. In the same paper I have pointed out that the acetone forming function from butyric acid is to some extent stronger in a glycogen-poor liver than in a glycogen-rich liver, but there is a case where the acetone forming function from butyric acid is distinctly lowered in a glycogen-poor liver. Considering these results obtained in the foregoing experiments, it appeared to me to be of great interest to investigate the acetone forming function of damaged livers in which generally the stored glycogen is more or less markedly diminished. So I have extended the previous experiments on dogs nourished with a high-fat diet or fasting to dogs whose livers were damaged by various methods. In the present experiments the histological pictures of the livers were parallelly investigated, besides the fat and glycogen content in them.

Note on methods.

For damaging the livers phosphorus, phenylhydrazine, tolu-

* This article was reported in the thirty-fourth annual meeting of the Japanese Society of Internal Medicine (held at Tokyo, Japan, April 1-3, 1937).

lenediamine, carbon tetrachloride and chloroform, which are generally accepted as liver poisons, were employed. As additional experiments the acetone forming function of the liver in the case of obstructive jaundice and of pancreas-diabetes was investigated. The acetone forming function was investigated by the same method as described in the previous report. For the purpose of histological investigations, the livers were stained with hematoxylin and eosin, and sudan III for fat and according to Best's carmin method for glycogen.

I. EXPERIMENTS IN CONTROL ANIMALS.

It was hard to let poisoned or operated dogs eat a definite quantity of food because of anorexia or vomitting; therefore, they were not fed from one day before the administration of the poison or the operation to the time at which the animals were bled to death from the carotid arteries for the perfusing investigation of the liver. This duration was 3-4 days. So I have investigated the influence of 3-4 days fasting upon the acetone forming function of the liver from butyric acid.

Results.

The results are shown in Table Ia and Ib. In the control series of experiments, the amount of the total acetone in the perfusion fluid is slightly decreased after the perfusing in the case of 3 days fasting, and also in the case of 4 days fasting. In the main series of experiments the amount of the total acetone in the perfusion fluid is increased after the perfusing in both cases of fasting. The average value for the total acetone increased per 100 g liver is 10.1 mg in the case of 3 days fasting, and 8.5 mg in that of 4 days fasting. These values are nearly equal to the average value (8.9 mg) obtained in dogs nourished with a normal mixed diet. Histological pictures: No. 94. No marked pathologic change in the liver. Glycogen in small amount in the liver cells. Fat in small amount in some liver cells and in some Kupffer cells. No. 99. No marked pathologic change in the liver. Glycogen in small amount in some liver cells. Fat not proved.

TABLE I a.
Investigations on 3 days fasting dogs.

Date	Sex No.	B.W. (kg)	Condition	Liver			Blood (cc.)	Acet. (mg%)	Acetoa. acid (mg%)	β -hydroxyb. acid (mg%)	Total acet.	Incr. or decr. of T.A. per 100 g. liver (mg)
				Weig. (g)	Glyc. (%)	Fat (%)						
4/XI	91	13.0	no added	366			400	Bef. 1.7	7.3	7.9	10.2	
	♂							Aft. 1.7	8.8	6.2	10.1	- 0.1
5/XI	92	10.0	"	310			350	Bef. 0.1	5.5	7.0	7.1	
	♂							Aft. 0.3	2.9	7.5	6.0	- 1.2
			(average)									- 0.6
8/XI	93	9.5	lg. butyr. acid added	270	0.81	2.21	350	Bef. 2.2	5.8	3.3	7.2	
	♂							Aft. 3.0	9.1	9.5	13.3	+ 7.9
11/XI	94	10.4	"	229	0.63	2.41	400	Bef. 1.0	6.6	4.1	6.9	
	♂							Aft. 2.5	9.6	9.1	12.9	+ 10.4
12/XI	95	9.0	"	238	0.83	2.11	330	Bef. 1.1	6.2	5.4	8.1	
	♂							Aft. 1.8	14.3	12.5	16.8	+ 12.0
			(average)		0.76	2.24						+ 10.1

TABLE I b.
Investigations on 4 days fasting dogs.

Date	Sex No.	B.W. (kg)	Condition	Liver			Blood (cc.)	Acet. (mg%)	Acetoa. acid (mg%)	β -hydroxyb. acid (mg%)	Total acet. (mg%)	Incr. or decr. of T.A. per 100 g. liver (mg)
				Weight (g)	Glyc. (%)	Fat (%)						
15/XI	96	9.5	no added	291			350	Bef. 0.3 Aft. 0.1	5.3 6.2	7.0 3.7	7.4 5.6	— 2.1
16/XI	97	8.1	"	322			350	Bef. 2.9 Aft. 2.5	7.3 6.6	7.9 6.6	11.4 9.8	— 1.7
			(average)									— 1.9
11/XII	98	8.5	lg. butyr. acid added	251	0.66	2.09	300	Bef. 0.1 Aft. 0.1	5.5 12.1	5.0 12.9	5.9 13.9	+ 9.5
15/XII	99	11.0	"	236	0.97	2.10	400	Bef. 1.0 Aft. 3.4	6.2 9.9	5.4 10.0	7.5 14.5	+11.4
16/XII	100	15.2	"	365	0.54	2.49	400	Bef. 0.5 Aft. 0.1	8.4 11.7	9.1 14.1	10.2 14.5	+ 4.7
			(average)		0.72	2.23						+ 8.5

II. EXPERIMENTS WITH PHOSPHORUS.

Methods.

After one day fasting 0.0015 g phosphorus (per kilo, per day, in 0.5% olive oil solution) was injected subcutaneously for 2 days and about 24 hours after the last injection the dogs were killed for the perfusing investigation.

Results.

The results are shown in Table II. In the control series of experiments the amount of the total acetone in the perfusion fluid is slightly decreased after the perfusing. In the main series of experiments the amount of the total acetone in the perfusion fluid is increased after the perfusing, but the average value for the total acetone increased per 100 g liver is far smaller than that obtained in control animals. Histological pictures: No. 104. Small necrotic areas in hepatic lobules. Glycogen not proved. Fat in moderate amount in the liver cells of central part of hepatic lobules and in Kupffer cells. The same pictures were observed also in No. 105.

III. EXPERIMENTS IN DOGS WITH OBSTRUCTIVE JAUNDICE.

Methods.

After one day fasting laparotomy was performed under ether narcosis and the common bile-duct were ligatured to produce jaundice. Three days later the dogs, the sclerotics of which were yellowly discoloured, were killed for the perfusing investigation. The bilirubin content in the blood serum was determined according to Hijmans van den Bergh.

Results.

The results are shown in Table III. In the control series of experiments the amount of the total acetone in the perfusion fluid is slightly decreased after the perfusing. In the main series of experiments the amount of the total acetone in the perfusion fluid is increased after the perfusing, but the average value for the total acetone increased per 100 g liver shows no difference compared with that obtained in control animals. Histological pictures:

TABLE II.
Investigations on dogs poisoned with phosphorus.

Date	Sex No.	B.W. (kg)	Condition	Liver		Blood (cc.)	Acet. (mg%)	Acetoa. acid (mg%)	β -hydroxyb. acid (mg%)	Total acet. (mg%)	Incr. or deer. of T.A. per 100 g. liver (mg)
				Wt., (g)	Glyc. (%)	Fat (%)					
20/XII	101	10.1	no added	290			Bef. 2.0	8.8	9.5	12.2	
	♂						Aft. 1.5	7.7	7.0	9.7	-2.7
22/XII	102	9.5	"	322			Bef. 0.6	4.0	5.8	6.0	
	♂						Aft. 0.3	3.3	5.8	5.3	-0.6
			(average)								-1.6
25/XII	103	15.5	lg. butyr. acid added	350	0.34	3.09	Bef. 0.8	4.0	5.0	5.7	
	-						Aft. 1.7	5.8	10.0	9.4	+4.2
28/XII	104	8.8	"	295	0.13	3.79	Bef. 0.8	5.1	3.3	5.5	
	♀						Aft. 1.3	6.2	3.7	6.8	+1.3
2/IX	105	9.0	"	225	0.25	3.68	Bef. 1.3	7.3	6.2	8.8	
	♂						Aft. 1.0	9.1	10.0	11.6	+4.9
			(average)		0.24	3.52					+3.4

TABLE III.
Investigations on dogs with obstructive jaundice.

Date	Sex No.	B.W. (kg)	Condition	Liver Weig. (g)	Glyc. (%)	Fat (%)	Blood (cc)	Bilir. (mg%)	Acet. (mg%)	Acetona. acid (mg%)	β -hydroxyb. acid (mg%)	Total acet. (mg%)	Incr. or decr. of T.A. per 100 g. liver (mg)
4/IX	106 ♂	9.5	no added	297			300	0.5	Bef. 1.1	3.5	4.1	5.2	
5/IX	107 ♂	9.5	"	325			330	0.8	Aft. 1.0	3.3	3.7	4.8	- 0.4
	108 ♀		"						Bef. 3.4	4.7	10.0	11.5	
	109 ♂		"						Aft. 2.5	5.1	8.3	10.0	- 1.5
7/IX	108 ♀	9.3	lg. butyr. acid added	237	0.87	4.22	300	0.8	Bef. 0.1	4.4	6.2	6.0	- 0.9
11/IX	109 ♂	9.8	"	417	1.00	2.65	400	0.6	Aft. 0.1	14.3	14.1	16.0	+ 12.6
	110 ♂	11.9	"	318	0.61	4.29	350	0.5	Bef. 1.3	8.4	8.7	10.3	+ 5.1
17/IX	110 ♂		"						Aft. 1.3	11.7	14.1	15.7	
			"						Bef. 1.3	2.2	1.6	3.4	+ 7.8
			"						Aft. 1.7	7.7	4.5	10.5	+ 8.5
			(average)		0.82	3.72							

New formation of bile-duct. Marked congestion. Glycogen in relatively large amount in some liver cells. Fat in small amount in the liver cells of central part of hepatic lobules. No. 110. New formation of bile-duct. Marked congestion. Glycogen in relatively large amount in the liver cells. Fat in relatively large amount in epithelial cells of bile-duct.

IV. EXPERIMENTS WITH PHENYLHYDRAZINE.

Methods.

After one day fasting 0.05 g phenylhydrazine hydrochloride (per kilo, in 5% solution, neutralised with NaOH) was injected subcutaneously and 3 days later the dogs were killed for the perfusing investigation.

Results.

The results are shown in Table IV. In the control series of experiments the amount of the total acetone in the perfusion fluid is slightly decreased after the perfusing. In the main series of experiments the amount of the total acetone in the perfusion fluid is increased after the perfusing, but the average value for the total acetone increased per 100 g liver is distinctly smaller than that obtained in control animals. Histological pictures: No. 114. No marked change in the liver cells. Swelling of Kupffer cells. Glycogen not proved. Fat also not proved. The same pictures were observed in No. 115.

V. EXPERIMENTS WITH TOLUILENEDIAMINE.

After one day fasting 0.05 g toluidenediamine (per kilo, in 2.5% solution) was injected subcutaneously and 3 days later the dogs were killed for the perfusing investigation.

Results.

The results are shown in Table V. In the control series of experiments the amount of the total acetone in the perfusion is slightly decreased after the perfusing. In the main series of experiments the amounts of the total acetone in the perfusion fluid is increased after the perfusing, with the exception of No. 120. The average value for the total acetone increased per 100 g liver

TABLE IV.
Investigations on dogs poisoned with phenylhydrazine.

Date	Sex No.	B.W. (kg)	Condition	Liver Weig. (g)	Glyc. (%)	Fat (%)	Blood (cc.)	Bilir. (mg%)	Acet. (mg%)	Aceton. acid (mg%)	β -hydro- xyb. acid (mg%)	Total acet. (mg%)	Incr. or deer. of T.A. per 100 g. liver (mg)
20/IX	111	9.9	no added	330			350	0.5	Bef.	0.1	1.8	2.0	2.2
	♂								Aft.	0.3	0.7	1.7	-0.5
21/IX	112	10.1	"	351			360	0.6	Bef.	2.5	5.1	8.1	
	♂								Aft.	0.1	4.7	4.7	-2.3
			(average)										-1.4
28/IX	113	10.5	lg. butyr. acid added	246	0.89	2.01	300	0.5	Bef.	1.0	4.0	5.4	
	♂								Aft.	1.7	5.1	6.6	+1.4
29/IX	114	9.6	"	372	0.09	2.92	400	1.4	Bef.	0.6	6.6	7.2	
	♂								Aft.	0.6	6.9	10.0	+3.0
2/X	115	8.2	"	250	0.46	2.02	300	0.4	Bef.	1.8	2.9	7.5	
	♂								Aft.	2.0	10.2	12.8	+6.3
			(average)		0.48	2.31							+3.5

TABLE V.
Investigations on dogs poisoned with tolulenediamine.

Date	Sex No.	B.W. (kg)	Condition	Liver		Blood (cc.)	Bilir. (mg%)	Acet. (mg%)	Acetoad. acid (mg%)	β -hydro- xyb. acid (mg%)	Total acet. (mg%)	Incr. or, decr of T.A. per 100 g. liver (mg)
4/X	116	10.1	no added	302	Weig. Glyc. Fat (g) (%) (%)	350	10.2	Bef. 1.8 Aft. 0.5	8.0	10.0	11.8	-4.0
5/X	117	9.8	"	285		300	15.5	Bef. 0.8 Aft. 1.1	5.1	6.2	7.1	-0.6
			(average)									-2.3
8/X	118	11.2	lg. butyr. acid added	231	0.41 2.39	400	7.0	Bef. 0.6 Aft. 1.3	3.5	2.9	4.1	+2.7
9/X	119	15.0	"	322	0.48 4.31	400	12.5	Bef. 0.1 Aft. 1.3	2.2	3.3	3.1	+5.8
12/X	120	15.2	"	342	0.48 3.41	400	17.0	Bef. 2.2 Aft. 1.5	5.0	4.4	7.4	0
			(average)		0.45 3.37				4.4	6.2	7.4	+2.8

is far smaller than that obtained in control animals. Histological pictures: No. 119. Atrophy of the liver cells. Fatty change in some liver cells. Swelling of Kupffer cells. Glycogen not proved. Fat in relatively large amount in the liver cells in peripheral part of hepatic lobules. No. 120. Slight atrophy of the liver cells. Necrosis of some liver cells. Slight swelling of Kupffer cells. Glycogen only in traces in some liver cells. Fat not proved.

VI. EXPERIMENTS WITH CARBON TETRACHLORIDE.

Methods.

After one day fasting 1 cc. carbon tetrachloride (per kilo) was administered by stomach sound and 3 days later the dogs were killed for the perfusing investigation.

Results.

The results are shown in Table VI. In the control series of experiments the amount of the total acetone in the perfusion fluid is slightly decreased after the perfusing. In the main series of experiments the amount of the total acetone in the perfusion fluid is increased after the perfusing, but the average value for the total acetone increased per 100 g liver is distinctly smaller than that obtained in control animals. Histological pictures: No. 124. Necrotic area in central part of hepatic lobules. Fatty change in the necrotic area. Glycogen not proved. Fat in large amount in the necrotic area in central part of hepatic lobules. The same pictures were observed in No. 125.

VII. EXPERIMENTS WITH CHLOROFORM.

Methods.

After one day fasting 0.5 cc. chloroform (per kilo, per day) was injected subcutaneously for 3 days, and 6 hours after the last injection the dogs were killed for the perfusing investigation.

Results.

The results are shown in Table VII. In the control series of experiments the amount of the total acetone in the perfusion fluid is slightly decreased after the perfusing. In the main series of experiments the amount of the total acetone in the perfusion

TABLE VI.
Investigations on dogs poisoned with carbon tetrachloride.

Date	Sex No.	B.W. (kg)	Condition	Liver			Blood (cc.)	Acet. (mg%)	Aceton. acid (mg%)	β -hydroxyb. acid (mg%)	Total acet. (mg%)	Incr. or decr. of T.A. per 100 g. liver (mg)
				Wt. (g)	Glyc. (%)	Fat (%)						
25/X	121 ♂	13.3	no added	336			400	Bef. 1.1 Aft. 1.0	6.6 4.0	5.0 5.8	7.5 6.4	-1.3
27/X	122 ♂	9.4	"	240			300	Bef. 0.6 Aft. 0.8	5.8 4.0	7.0 5.4	7.7 6.0	-2.1
			(average)									-1.7
29/X	123 ♂	13.0	lg. butyr. acid added	244	0.41	2.82	400	Bef. 1.7 Aft. 2.2	6.9 7.7	4.1 5.8	7.8 9.7	+3.1
31/X	124 ♂	11.3	"	226	0.07	2.62	400	Bef. 0.8 Aft. 0.8	6.6 12.8	4.1 5.8	6.7 11.2	+7.9
2/XI	125 ♂	13.5	"	265	0.45	2.11	400	Bef. 2.7 Aft. 3.4	6.6 7.3	4.5 7.5	8.9 12.6	+5.5
			(average)		0.31	2.52						+5.5

TABLE VII.
Investigations on dogs poisoned with chloroform.

Date	Sex No.	B.W. (kg)	Condition	Liver			Blood (cc.)	Acet. (mg%)	Acetoa. acid (mg%)	β-hydroxyb. acid (mg%)	Total acet. (mg%)	Incr. or decr. of T.A. per 100 g. liver (mg)
				Weig. (g)	Glyc. (%)	Fat (%)						
18/XI	126 ♂	9.5	no added	329			350	Bef. 2.2 Aft. 2.0	8.8 6.2	7.9 8.7	11.6 10.3	-1.3
27/XI	127 ♂	10.1	"	338			300	Bef. 2.5 Aft. 2.5	10.6 6.9	6.2 8.3	11.9 11.0	-0.7
28/XI	128 ♂	11.1	(average)	280	0.48	2.12	280	Bef. 1.0 Aft. 1.6	9.5 6.6	5.4 8.3	9.4 9.9	+0.5
30/XI	129 ♂	9.2	lg. busyr. acid added	172	0.56	2.49	260	Bef. 0.6 Aft. 0.8	6.9 8.0	6.6 9.5	8.1 10.5	+3.6
9/XII	130 ♂	8.4	"	252	0.57	4.35	250	Bef. 1.1 Aft. 2.5	7.3 10.2	2.9 14.5	6.8 16.3	+9.4
			(average)		0.54	2.99						+4.5

fluid is increased after the perfusing, but the average value for the total acetone increased per 100 g liver shows no marked difference compared with that obtained in control animals. Histological pictures: No. 129. Fatty degeneration and marked vacuolar degeneration in the liver cells in central part of hepatic lobules. Glycogen in small amount in peripheral part of hepatic lobules. Fat in large amount in central part of hepatic lobules. The same pictures were observed in No. 130.

VIII. EXPERIMENTS IN PANCREAS-DIABETIC DOGS.

Methods.

After one day fasting laparotomy was performed under ether narcosis and the pancreas was totally extirpated. Three days after the operation the dogs were killed for the perfusing investigation.

Results.

The results are shown in Table VIII. In the control series of experiments the amount of the total acetone in the perfusion fluid is slightly decreased after the perfusing. In the main series of experiments the amount of the total acetone in the perfusion fluid is increased after the perfusing, but the average value for the total acetone increased per 100 g liver shows no marked difference compared with that obtained in control animals. Histological pictures: No. 134, granularly changed protoplasm in the liver cells. Swelling of Kupffer cells. Glycogen not proved. Fat in large amount in the liver cells and in Kupffer cells. The same pictures were observed in No. 135. Embden and Lattes (1908) have observed by their perfusing investigation that the acetone formation in the pancreas-diabetic liver is much larger than in the normal liver. But I could not confirm their result. This will be partly explained by the fact that in my pancreas-diabetic dogs the Legal and Gerhardt reaction in the urine were always negative, although a marked glucosuria was observed.

GENERAL DISCUSSION.

For convenience of general discussion the results in my experiments series are summarized in Table IX. From this table

TABLE VIII.
Investigations on pancreas-diabetic dogs.

Date	Sex No.	B.W. (kg)	Condition	Liver			Blood (cc.)	Acet. (mg%)	Acetona. acid (mg%)	3-hydroxyb. acid (mg%)	Total acet. (mg%)	Incr. or decr. of T.A. per 100 g. liver (mg)
				Wt. (g)	Glyc. (%)	Fat (%)						
7/XII	131	9.5	no added	329			350	Bef. 2.2 Aft. 1.1	8.8 6.2	7.9 8.7	11.6 9.4	- 2.3
		♂										
9/XII	132	10.1	"	338			300	Bef. 2.5 Aft. 2.5	10.6 6.9	6.2 8.3	11.9 10.9	- 0.8
		♂										
			(average)									- 1.5
9/I	133	11.2	lg. butyr. acid added	302	0.27	3.89	300	Bef. 2.5 Aft. 2.5	5.1 15.4	4.1 12.5	7.6 18.1	+ 10.4
9/II	134	14.5	"	296	0.39	6.24	300	Bef. 3.1 Aft. 4.5	6.6 15.4	7.5 10.0	10.9 18.7	+ 7.9
		♂										
12/II	135	12.7	"	275	0.43	4.81	300	Bef. 0.8 Aft. 2.5	4.4 8.4	5.0 7.9	6.0 11.6	+ 6.1
		♂										
			(average)		0.36	4.98						+ 8.1

we see that the acetone forming function of the liver from butyric acid is distinctly lower in dogs poisoned with phosphorus, phenylhydrazine, toluilenediamine, carbon tetrachloride and chloroform than in control animals, although the glycogen content in the liver is more or less smaller in the former than in the latter and the fat content in the organ is more or less larger in the former than in the latter. I believe that this is a very interesting discovery. In dogs with obstructive jaundice or pancreas-diabetes the acetone forming function of the liver from butyric acid shows no marked difference compared with control animals. These cases were investigated three days after the ligature of the common bile-duct or pancreas extirpation. Therefore, on the acetone forming function of the liver in the further course of these diseases, my results give no conclusion. For the solution of this problem further investigation is required.

TABLE IX.
Showing the average value of 3 cases.

Condition	Liver		Amount of total acetone increased per 100 g. liver (mg)
	Glycogen (%)	Fat (%)	
3 days fasting (control)	0.76	2.24	10.1
4 days fasting (control)	0.72	2.23	8.5
Phosphorus poisoning	0.24	3.52	3.4
Obstructive jaundice	0.82	3.72	8.5
Phenylhydrazine poisoning	0.48	2.31	3.5
Toluilenediamine "	0.45	3.37	2.8
Carbon tetrachloride "	0.31	2.52	5.5
Chloroform "	0.54	2.99	4.5
Pancreas-diabetes	0.36	4.98	8.1

Today it is generally considered that the liver occupies the most important position in the ketone metabolism. Upon the basis of this opinion, the ketone metabolism in patients with hepatic damage has been seriously investigated by many clinicians, but the results do not agree. According to Labbé (1922), Fischler (1925),

Berlin and Jitz (1928), Seeling (1931), Stroebe (1931), etc. the acetone content in the blood or urine is increased in patients with hepatic damage. Fischler has especially emphasized that acetonuria is an accurate sign of liver damage. According to Clerc (1931) the acetone output in the urine is decreased in patients with hepatic damage. According to Feigl and Luce (1918), Scherk (1929), Hikuma (1930), etc. the acetone content in the blood or urine of patients with hepatic damage shows no remarkable difference compared with that of persons with normal livers. In spite of these numerous clinical investigations, animal experiments on the ketone metabolism in conditions of hepatic damage are relatively rare. Isaac (1917) has observed by his perfusing investigation that the acetone formation in phosphorus liver shows no marked difference compared with a normal liver. Kobayashi and Oka (1926) have observed by their perfusing investigation that hepatoxin has no marked influence upon the acetone forming function of the liver from butyric acid. According to Watanabe (1928) the acetone content in the blood of phosphorus-poisoned rabbits shows no remarkable difference compared with control animals, even when butyric acid is administered. According to Stroebe (1931), however, hyperketonaemia is observed in phosphorus-poisoned animals. Recently Murakami (1934) has observed that the acetone content in the blood or urine of rabbits poisoned with various liver poisons (carbon tetrachloride, chloroform, phosphorus, etc.) is increased, but this increase is very slight, even if the dose of the poison is large. Upon this experimental result, he has expressed the opinion that the acetone forming function is raised in the slightly damaged liver, but lowered in the severely damaged liver. In my present experiments with various liver poisons I have observed in all cases a lowering of the acetone forming function of the liver from butyric acid. But I have no compelling reasons against Murakami's opinion, above mentioned, because in my experiments relatively larger doses of the liver poisons were administered in all cases, and a more or less marked retrogressive process in the liver was observed in the majority of the cases. From my present results I can only

say that the acetone forming function from butyric acid can be lowered in damaged livers.

SUMMARY.

By experiments on dogs the following results were obtained.

1. 3-4 days fasting has no marked influence upon the acetone forming function of the liver from butyric acid.

2. As far as my experimental results go, in dogs with obstructive jaundice or pancreas-diabetes the acetone forming function of the liver from butyric acid shows no marked difference compared with control animals.

3. In dogs poisoned with phosphorus, phenylhydrazine, toluenediamine, carbon tetrachloride and chloroform the acetone forming function of the liver from butyric acid is lowered.

4. As far as butyric acid is concerned, a strict parallelism between the acetone forming function of the liver and its histological change is not proved.

I wish to express my gratitude to Prof. N. Kageura for suggesting this study and his guidance throughout the course of my research. My thanks are due to Dr. M. Hashiguchi and Dr. K. Inoue in the Pathological Institute also for their help and advice in making the histological investigations herein reported.

REFERENCE.

- Berlin, L. and Jitz, J. (1928): *Zeitschr. f. kl. Med.*, **109**, 342.
 Clerc, P. (1931): *Zeitschr. f. kl. Med.*, **118**, 532.
 Embden, G. and Lattes, L. (1908): *Beitr. z. chem. Phys. u. Path.*, **11**, 327.
 Feigl, J. and Luce, H. (1918): *Biochem. Zeitschr.*, **86**, 48.
 Fischler, F. (1925): *Physiologie und Pathologie der Leber*, 2.
 Hikuma, M. (1930): *Journ. of Gastroenterology*, **5**, 47.
 Isaac, S. (1917): *Zeitschr. f. phys. Chem.*, **100**, 1.
 Kobayashi, M. and Oka, M. (1926): *Okayama Igakkai Zasshi*, **436**, 566.
 Labbé, M. (1922): cited after *Berichte ü. d. ges. Phys. u. exp. Pharm.*, **14**, 159.
 Murakami, H. (1934): *Journ. of Gastroenterology*, **9**, 561.
 Scherk, G. (1929): *Zeitschr. f. d. ges. exp. Med.*, **64**, 281.
 Seeling, S. (1931): *Zeitschr. f. d. ges. exp. Med.*, **79**, 381.
 Stroebe, F. (1931): *Zeitschr. f. kl. Med.*, **118**, 507.
 Watanabe, K. (1928): *Aichi Igakkai Zasshi*, **35**, 381.

ÜBER DIE PROTEOLYTISCHEN FERMENTE DER PANKREASDRÜSE DES KANINCHENS.

III. Mitteilung: Über die Aktivierung des Sekret- trypsinogens des Kaninchens.

VON

FUYUTAROO ITZIOKA.

(Aus dem Utzino-Laboratorium des Institutes für Chemie an der Kaiserlichen
Universität Kyoto. Vorstand: Prof. Dr. S. Utzino.)

(Eingegangen am 14. Dezember 1936).

Nach den ältesten Angaben von W. Kühne (1867) über eine unwirksame Vorstufe des Pankreastrypsins und von Heidenhain (1875) über ihre Aktivierung ist von der neueren Forschung viel Wertvolles betreffs der Aktivierung des Trypsinogens beigesteuert worden.

Die neuen ergebnisreichen Untersuchungen über die Enterokinase von E. Waldschmidt-Leitz und seiner Schule stammen aus den Jahren 1924 bis 1928. Es handelt sich hier aber hauptsächlich um das inaktive Trypsin des Drüsenausgusses des Schweins, wobei die Aktivierungsweise der Pankreaskinase sowie Enterokinase klargelegt wurde.

In der vorangehenden Abhandlung (1936) ist über die Sekrettrypsinwirkung des Kaninchenpankreas, welches Sekret erst durch die Enterokinase der Dünndarmschleimhaut aktiviert werden kann, berichtet worden. In der vorliegenden Arbeit habe ich weiter unter Leitung von Prof. S. Utzino die Aktivierung des (in situ) inaktiven Safttrypsin der Pankreasdrüse unter Berücksichtigung der Faktoren, die bisher von vielen Autoren als Aktivator betrachtet worden sind, untersucht.

N. P. Schepowalikow (1899), Schüler von Pawlow, veröffentlichte wichtige Untersuchungen über den Aktivator des Trypsins im Duodenalsaft. Er bezeichnete diesen als Enterokinase, wobei er zeigte, dass die Aktivierung des inaktiven Fistelsaftes

sowohl in alkalischer als auch noch besser in neutraler und schwach saurer Lösung in Erscheinung trat.

Die seit den Untersuchungen Heidenhains (1875) herrschende Ansicht, dass der Umsatz des Trypsinogens in Trypsin auch durch Säure gefördert wird, soll jedoch nach Hekma ebenfalls nicht zutreffen.

Diesbezüglich habe ich den Einfluss der Gase und der Mediumreaktion auf die Aktivierung studiert und festgestellt, das Durchleiten von Luft oder Leuchtgas und die Zugabe von Salzsäure, Schwefelsäure oder Natronlauge ohne Einfluss blieben (Tabelle V. u. VI).

Bei der Prüfung der aktivierenden Wirkung der Gewebsbestandteile hat man zuerst festgestellt, dass unter den angegebenen Bedingungen das Sekrettrypsinogen durch Kinasepulver bei Raumtemperatur (30 Min.) ebenso wie bei 37°C vollaktiviert werden kann (Tabelle VII). C. Delezenne vertrat die Ansicht, dass die Kinase ihren Ursprung in den weissen Blutzellen und lymphatischen Ganglien habe, wenngleich dieser Meinung auch von anderen Forschern widersprochen wurde.

In den vorliegenden Untersuchungen liess sich weiter nachweisen, dass der Pankreassaft des Kaninchens weder durch Zusatz von Blutbestandteilen noch des Trockenpulvers von verschiedenen Geweben aktiviert wird (Tabelle VIII).

Hier ist aber noch zu erwähnen, dass unter den Versuchen mit dem Glycerinmazerationssaft des Gewebes nur diejenigen mit Niere, Milz oder Magen unternommenen eine deutliche Aciditätszunahme, u. zw. erst nach 72 Stunden langer Digestion zu bewirken vermochten (Tabelle IX).

Es liegt zudem nicht nahe anzunehmen, dass der Befund bei der Aktivierung mittels des Gewebsmazerationssaftes ganz identisch mit dem bei der Aktivierung mittels der Dünndarmenterokinase sei, da bei den mit dem Mazerationssaft der Dünndarmschleimhaut angestellten Versuchen eine deutliche Aciditätszunahme schon nach 5 Stunden beobachtet wurde, wie dies auch bei den Versuchen mit Kinasepulver der Fall war.

Da die Selbstaktivierung des Pankreassaftes des Kaninchens

(bei Digestion oder Aufbewahrung) sehr langsam nur in schwachem Grad vorsiehging (Tabelle I), ist dieses Aktivwerden des inaktiven Saftes durch die Gewebsmazerationen nach einer Latenz sehr auffällig. Über eine spontane Aktivierung des Trypsins in der Pankreasdrüse und ihren Auszügen ist erst im Jahre 1875 von R. Heidenhain (1875) berichtet worden. Neuerdings haben E. Waldschmidt-Leitz und seine Schüler indessen den Nachweis geführt, dass es sich bei der Selbstaktivierung in dem Drüsenauszug um die Bildung eines Aktivators aus Pankreasdrüsensubstanz handelt, der in seinem Verhalten, z. B. seinem Adsorptionsverhalten, mit der Enterokinase weitgehend übereinstimmt. Die Annahme, dass dieser Aktivator mit der Enterokinase identisch ist, dürfte aber noch nicht als bewiesen betrachtet werden.

Wie schon in der ersten Mitteilung berichtet wurde (1936), spricht nun die aktive Trypsinwirkung des Mazerationssaftes der Pankreasdrüse des Kaninchens durchaus für diese Tatsache. Andererseits wird auch von anderen Forschern wie von Sawitsch (1908) eine Selbstaktivierung des Saftes in gewissen Fällen angenommen.

In den hier angestellten Versuchen wurde der Einfluss unter verschiedenen Bedingungen wie Umrührung, Aufbewahrung, verlängerte Digestion oder Trocknung betreffs des inaktiven Saft-trypsinogens untersucht. Nur bei Aufbewahrung sowie nach Trocknung und bei protrahierter Digestion hat man eine schwach aktivierte Trypsinwirkung beobachtet; Umrührung, Lüften etc. dagegen haben fast keinen Einfluss ausgeübt (Tabelle, I, II, III, u. IV). Bei den Versuchen, die mit Sauerstoff, Wasserstoff oder Schwefelwasserstoff im Sinne eines Oxydoreduktionsverhaltens angestellt wurden, ist keine aktivierende Wirkung beobachtet worden (Tabelle V). Die Angaben von C. Delezenne (1905–7), dass Calcium- und andere Erdalkalisalze zur Aktivierung von tryptisch unwirksamem Drüsensekret befähigt sind, wurden seiner Zeit von E. Zung (1906–7) bestätigt.

Auch A. Frouin und A. Compton (1911) fanden bei dialysiertem unwirksamen Pankreassaft Kalksalze wirksam; ebenso berichteten K. Meyer sowie F. Wohlgemuth (1909–1912) über

schwankende Ergebnisse bei der Wirkung auf inaktives Sekret.

Nach T. Mellanby u. V. J. Woolley (1913) soll die Zugabe von Ca-Salz nur die Trypsinbildung beschleunigen, indem die Saftalkalität bei der Ca-Zugabe durch Bildung von unlöslichem kohlensauren Salz herabgesetzt wird, doch soll das Ca-Salz für die Trypsinbildung selbst nicht verantwortlich sein.

In seiner Untersuchung konnte E. Waldschmidt-Leitz (1924) keine aktivierende Wirkung von Calciumchlorid auf frisches tryptisch unwirksames Drüsenmaterial beobachten, hingegen war die Gelatine-Hydrolyse durch mittels Enterokinase aktiviertes Trypsin (Pulverauszug) sowohl bei alkalischer als auch bei saurer Reaktion nach Zusatz von Kalksalz deutlich herabgesetzt. Die Zugabe von Na-glykocholicum, für das einige Autoren (1900, 1906–7) einen fördernden Einfluss notierten, übte bei alkalischer Reaktion keinen Einfluss, einen hemmenden aber im sauren Gebiete; schon W. E. Ringer (1922–23) fand gallensaures Salz ohne Wirkung.

In den hier mit verschiedenen Salzen und Kaninchengalle verschiedener Konzentration angestellten Versuchen konnte man keinen aktivierenden Einfluss betreffs des Safttrypsinogens beobachten (Tabelle VI u. X).

EXPERIMENTELLER TEIL.

Der Pankreassaft des Kaninchens wurde in der Weise wie schon berichtet, gesammelt. 20 ccm 1%iger Casein- oder Gelatine-lösung wurden als Substratlösung unter Zusatz von 2 oder 4 ccm (aufs 20 oder 40 fache) verdünnter Pankreassaftlösung und etwas Toluol bei 37° digeriert (bei PH 7.5–8.0).

In den Tabellen ist die kontrollierte Aciditätszunahme (nach Sörensen) in 4 ccm Digestionslösung in 0.1 n-NaOH angegeben. Bei der Aktivierung mit Enterokinase wurden immer 0.025 g Trockenpulver der Dünndarmschleimhaut für 1 ccm Saft gebraucht.

Versuch I. Über die Selbstaktivierung des Pankreassaftes.

Um den mechanischen Einfluss auf den Pankreassaft zu

prüfen, wurde 1 cem Pankreassaft mit 3 cem Glycerin und 16 cem 0.8 %iger Kochsalzlösung 30 Minuten lang umgerührt. 20 cem 1%iger Caseinlösung wurden mit 2 cem dieser umgerührten als Hauptversuch oder mit 2 cem nicht umgerührter Saftlösung als Kontrolle digeriert. Die Aciditätszunahme im Hauptversuch betrug 0.05 cem nach 5 Std., 0.04 cem nach 24 Std. und 0.06 cem 0.1 n-NaOH nach 72 Std.; diejenige der Kontrolle 0.04 cem, respektive 0.06 cem und 0.07 cem 0.1 n-NaOH.

Also übte das Umrühren keinen aktivierenden Einfluss auf den Pankreassaft.

TABELLE I.

Selbstaktivierung bei der Digestion (20 cem 1%ige Caseinlösung, 4 cem (20 fach) verdünnter Saft, $P_H = 7.5$).

Digestionszeit (Tage)	Aciditätszunahme in cem 0.1n-NaOH	
	nicht aktiviert	mit Kinase aktiviert
1	0.04	0.68
3	0.13	0.70
5	0.15	0.70
10	0.23	—

In der zweiten Mitteilung (1936) habe ich gezeigt, dass eine geringfügige Aciditätszunahme nach längerer Digestion der Eiweisslösung (z. B. 72 Std.) mit nicht aktiviertem Pankreassaft als Selbstaktivierung des Saftes zu betrachten ist. Aus Tabelle I erkennt man, dass diese Selbstaktivierung keine stetig fortschreitende, sondern nur eine beschränkte ist, da die Aciditätszunahme in dem Versuch mit Kinasepulver einen sehr bedeutenden Grad aufweist.

Der aseptisch gesammelte Pankreassaft wurde unter Toluolzusatz im Eisschrank aufbewahrt. (Tabelle II).

Der Saft wurde nach 63 tägiger Aufbewahrung in schwächerem Grade aktiviert jedoch nicht vollständig, während er nach 194 Tagen eine gleiche Aciditätszunahme wie der mit Kinase aktivierte Saft aufwies. Die Saftwirkung aber war im allgemeinen sehr viel schwächer geworden.

TABELLE II.

Einfluss der Aufbewahrung (20 cem Eiweisslösung, 4 cem (20 fach)
verdünnter Saft, $P_H=7.5$).

a) 2%ige Gelatinelösung.

Substrat	Zeit (Std.)	Aufbewahrung im Eisschrank unter Toluol			
		nach 63 Tagen		nach 194 Tagen	
		nicht aktiviert	aktiviert	nicht aktiviert	aktiviert
Casein	5	0.03	0.12		
	24	0.20	0.45	—	—
	72	0.39	0.49		
Gelatine (1%)	5	0	0.13	— a)	— a)
	24	0.05	0.33	0.25	0.25
	72	0.12	0.37	—	—

TABELLE III.

Einfluss der Trocknung (20 cem 1%ige Eiweisslösung, 4 cem (20 fach)
verdünnter Saft, $P_H=7.5$).

Substrat	Zeit (Std.)	nach 5 Monaten		nach 10 Monaten	
		nicht aktiviert	aktiviert	nicht aktiviert	aktiviert
Casein	5	—	—	0.12	0.11
	24	0.10	0.25	0.30	0.29
	72	0.26	0.57	0.37	0.38
Gelatine	5			0.11	0.10
	24	—	—	0.21	0.21
	72			0.25	0.26

Saft, welcher im Vakuumexsiccator getrocknet und aufbewahrt worden ist, wird wieder mit Wasser bis aufs Anfangsvolumen aufgelöst und aufs 20 fache verdünnt.

Nach 5 Monaten ist die Aktivierung noch nicht vollständig. Die Aciditätszunahme im Versuch mit dem Saft nach 10 Monate langer Trocknung zeigt, was seine Wirkung anbelangt, Vollaktivität und zwar desselben Grads wie im Versuch mit Kinase. Doch scheint im allgemeinen die Wirkung eine etwas abgeschwächte zu

sein. Diese Resultate stimmen gut mit denjenigen nach der Aufbewahrung im Eisschrank überein.

TABELLE IV.

Pur-Optima des getrockneten, selbstaktivierten Pankreassaftes (1 Jahr)
(20 ccm 1%ige Eiweisslösung, 4 ccm (20 fach) verdünnter Saft).

Substrat	Zeit (Std.)	pH						
		5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5
Casein	2	0	0.03	0.09	0.10	0.10	0.10	0.10
	4	0	0.05	0.15	0.14	0.13	0.13	0.13
	8	0.06	0.13	0.24	0.24	0.25	0.25	0.25
Gelatine	2	0	0.02	0.03	0.04	0.06	0.05	0.08
	4	0	0.02	0.05	0.07	0.08	0.08	0.08
	8	0	0.06	0.06	0.09	0.12	0.09	0.09

In den letzten Abhandlungen (1936) habe ich darauf aufmerksam gemacht, dass eine deutliche Caseinhydrolyse auch bei schwach saurer Reaktion auftreten kann. Diese Tatsache liess sich hier durch die mit dem getrockneten, 1 Jahr im Exsiccator aufbewahrten Pankreassaft angestellten Versuche bestätigen. Die Wirkung des getrockneten Saftes, der unter Selbstaktivierung allein ohne Zusatz von Kinase verwandt wurde, war sehr schwach und erregte bei Gelatine nur eine geringfügige Hydrolyse.

Versuch II. Über den Einfluss der verschiedenen Chemikalien auf den Pankreassaft.

Hier wurde der Einfluss der Gase, Salze und Säuren auf die Aktivierung des Pankreassaftes geprüft, aber bei allen diesen Untersuchungen zeigte sich keine Wirkung.

Durch die aufs 20 fache verdünnte Pankreassaftlösung leitet man verschiedene Gase 30 Minuten lang hindurch. Die Resultate zeigen keinen aktivierenden Einfluss auf den Pankreassaft.

5 ccm des mit Wasser aufs 20 fache verdünnten Pankreassaftes

TABELLE V.

Einfluss der Gase (20 ccm 1%ige Caseinlösung, 4 ccm (20 fach)
verdünnter Saft $\text{PH}=8.0$).

Zeit (Std.)	Gas				
	Luft	O ₂	SH ₂	H ₂	Leuchtgas
5	-0.02	0.02	-0.03	-0.02	-0.02
24	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02
72	0.02	0.06	0.01	0.02	0.02

wurden mit dem gleichen Volumen Salzlösung (bzw. Säure oder Alkali) verschiedener Konzentration gemischt und bei Raumtemperatur 30 Minuten lang stehen gelassen. Die Normalität in der Tabelle stellt die Konzentration in der Saft—Salzgemischlösung bei der Behandlung dar. Bei allen hier angestellten Versuchen auch mit CaCl_2 -Lösung hat man keinen aktivierenden Einfluss auf den Pankreassaft festgesetzt. Zur Kontrolle ist ein Versuch mit Kinaseaktivierung beigelegt. (Tabelle VI).

*Versuch III. Über den Einfluss der Gewebe sowie der
Galle auf den Pankreassaft.*

Um die hydrolysierende Wirkung des trocknen Pulvers der Dünndarmschleimhaut des Kaninchens auf Casein auszuschliessen, wurde hier ein Kontrollversuch mit dem Kinasepulver allein angestellt. 10 ccm einer mit Wasser aufs 20 fache verdünnten Pankreassaftlösung wurden mit 10 ccm 0.5%iger Pulversuspension (0.5 g Trockenpulver der Dünndarmschleimhaut in 100 ccm Wasser) vermischt und bei Raumtemperatur 30 Minuten lang stehen gelassen. 20 ccm 1%iger Caseinlösung wurden mit 4 ccm dieser Saft-KinaseLösung der Digestion bei 37° unterworfen. (Also 0.01 g Kinasepulver auf 20 ccm 1%iger Caseinlösung) Unter den gleichen Bedingungen enthält der Kontrollversuch nur Kinasepulver und Wasser statt der Saftlösung. Die Aciditätszunahme des Hauptversuchs: 0.56 ccm nach 24 Std. und 0.76 ccm 0.1n-NaOH nach 72 Std., dieselbe des Kontrollversuchs 0.08 ccm respektive 0.09 ccm 0.1n-NaOH. Hiermit wurde die hydrolysierende Wirkung

TABELLE VII.

Einfluss der Temperatur auf die Aktivierung des Pankreassaftes durch Kinase
(Trockenpulver der Dünndarmschleimhaut des Kaninchens)
(20 ccm 1%ige Caseinlösung, 4 ccm (40 fach) verdünnter
Saft mit 0.01 g Kinase, $P_H=8.0$).

Zeit (Std.)	Aktiviert bei 12°		bei 37°	
	2 ccm Saft	4 ccm Saft	2 ccm Saft	4 ccm Saft
5	0.05	0.11	0.18	0.29
24	0.39	0.43	0.39	0.46
72	0.41	0.45	0.42	0.49

des Kinasepulvers im angegebenen Mengenverhältnis praktisch ausgeschlossen.

In der Tabelle sind die Ergebnisse der Versuche angegeben, die einerseits mit einer bei Raumtemperatur (12°C) und andererseits mit einer bei 37° 30 Minuten lang mit dem Kinasepulver für 1 ccm Saft aktivierten Saftlösung angestellt wurden. Nach 5 stündiger Digestion ruft die bei 37° aktivierte Saftlösung eine stärkere Aciditätszunahme als bei Raumtemperatur hervor, nach 24 Stunden zeigt aber der Spaltungswert den gleichen Grad.

TABELLE VIII.

Einfluss des Gewebepulvers und der Blutbestandteile (20 ccm 1%ige Caseinlösung, 4 ccm (40 fach) verdünnte Saftlösung
mit 0.005 g Gewebepulver, $P_H=8.0$).

Zeit (Std.)	nicht be- handelt	Leber (bei 37°)	Niere (bei 37°)	Milz	Lunge	Magen- schleim- haut (bei 37°)	Blut- zellen	Serum
5	0.05	0.01	0.07	0.05	0.02	0.06	0.02	0.03
24	0.06	0.01	0.08	0.02	0.03	0.06	0.04	0.04
72	0.09	0.03	0.06	0.04	0.05	0.06	0.02	0.05

Der Gewebbrei des Kaninchens wurde durch Aceton und dann Äther in der gewöhnlichen Weise getrocknet.

0.05 g Gewebepulver wurden mit 1 ccm frischem Pankreassaft (mit Wasser auf 40 ccm verdünnt) bei 37° oder in Raumtemperatur

(ca. 12–16°) 30 Minuten lang behandelt.

1 cem Pankreassaft (mit Wasser auf 20 cem verdünnt) wurde mit den durch Zentrifugieren aus 2 cem Kaninchenblut abgetrennten Blutzellen in Raumtemperatur 30 Min. behandelt.

5 cem Saftlösung (aufs 10 fache verdünnt) wurden mit 5 cem Kaninchenblutserum in der gleichen Weise behandelt. Je 2 cem dieser beiden Saftlösungen wurden mit je 20 cem 1%iger Caseinlösung versetzt.

Aus der Tabelle sieht man, dass Gewebspulver und Blutbestandteile keinen aktivierenden Einfluss auf den frischen Pankreassaft üben.

TABELLE IX.

Einfluss des Mazerationssaftes des Gewebes (20 cem 1%ige Caseinlösung, 4 cem behandelte Saftlösung (10 fach verdünnt) mit 0.04 cem Mazeration, PH = 8.0).

Zeit (Std.)	Mazerationssaft						Dünndarm- schleimhaut	
	nicht be- handelt	Leber	Niere	Milz	Lunge	Magen- schleim- haut	ohne	mit
							Kinase	Kinase
5	0.03	0	0.01	0.02	0	0.02	0.56	0.56
24	0.03	0	0.09	0.04	0	0.12	0.84	0.58
72	0.08	0.03	1.20	0.35	0.08	0.58	1.10	1.15

1 Teil Gewebepulver wurde mit dem 6 fachen Volumen Glycerin-Wasser (6:4) zermahlen und koliert. 1 cem dieses Mazerationssaftes wurde mit 1 cem Pankreassaft (mit Wasser auf 9 cem verdünnt) vermischt und in Raumtemperatur 30 Min. stehen gelassen. In 24 stündiger Digestion blieb der Saft mit dem Gewebemazerationssaft ohne Wirkung. Bei dem Versuche mit der Nierenmazeration wurde aber nur nach 72 Stunden eine deutliche Aciditätszunahme beobachtet, die den Wert der Selbstaktivierung überschritt und sogar denjenigen des vollaktiven Saftes erreichte.

Nach dieser Digestionszeit haben auch die aus der Milz und Magenschleimhaut gewonnenen Mazerationssäfte einen Aciditäts-

zuwachs gezeigt.

Hier sei erwähnt, dass bei dem Kontrollversuch mit dem Mazerationssaft der Dünndarmschleimhaut eine deutliche Aciditätszunahme schon nach 5 Stunden beobachtet wurde.

Die Wirkung des mit dem Mazerationssaft der Dünndarmschleimhaut aktivierten Saftes wurde durch Zusatz von 0.01 g Kinasepulver nicht weiter verstärkt.

TABELLE X.

Einfluss der Galle (20 cem 1%ige Caseinlösung, 4 cem (20 fach) verdünnter Saft, Galle, $\text{pH}=8.0$).

Zeit (Std.)	Gallenmenge für 4 cem verdünnten Saft					
	0	1/100	1/50	1/20	1/10	1/5
5	0.05	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03
24	0.05	0	0.02	0.02	0.02	0.02
72	0.05	0	0.01	0.02	0.01	0.01

4 cem der mit Wasser aufs 20 fache verdünnten Saftlösung wurden mit verschiedenen Mengenteilen Kaninchengalle bei 37° 30 Minuten lang stehen gelassen.

Die Versuche wurden mit der mit Galle in Raumtemperatur (12°–16°C) behandelten Saftlösung wiederholt. Als Ergebnis war ebenfalls keine Wirkung zu verzeichnen.

LITERATUR.

- Delezenne, C. (1905–7): *Compt. rend. soc. biol.*, **141**, 781; **144**, 385.
 Frouin, A. u. Compton, A. (1911): *ebenda*, **153**, 1032.
 Heidenhain, R. (1875): *Pflügers Arch.*, **10**, 557.
 Itzioka, F. (1936): *J. Biochem. (Japan)*, **24**, 139; **24**, 267.
 Kühne, W. (1867): *Arch. (Anat. u.) Physiol.*, **37**, 130.
 Mellanby, T. u. Woolley, V. J. (1913): *J. Physiol.*, **46**, 159.
 Meyer, K. u. Wohlgemuth, J. (1909–12): *Biochem. Z.*, **23**, 68; **39**, 302.
 Ringer, W. E. (1922/23): *Z. physiol. Chem.*, **124**, 177.
 Schepowalinkow, N. P. (1899): *Malys Jahresber.*, **29**, 378.
 Sawitsch, W. (1909): *Biochem. Zentralbl.*, **1**, 169; **2**, 708.
 Waldschmidt-Leitz, E. u. seine Schüler (1924–1928): *Z. physiol. Chem.*, **132**, 181; **142**, 217; **149**, 221; **166**, 227; *Ber.*, **61**, 299, 640.
 Wohlgemuth, J. (1906/7): *Biochem. Z.*, **2**, 264.
 Zung, E. (1906/7): zitiert nach E. Waldschmidt-Leitz, *Z. physiol. Chem.*, **132**, 181 (1924).

ÜBER DEN EINFLUSS DER ERNÄHRUNG AUF DIE WIRKUNG DES ADRENALINS.

II. Mitteilung.*

VON

KEIZO YOSHIO.

(Aus der med. Universitätsklinik von Prof. Dr. N. Kageura,
Nagasaki, Japan).

(Eingegangen am 26. Dezember 1936)

In meiner I. Mitteilung (Jan. 1933) wurde angegeben, dass bei Hunden der Glykogengehalt sowohl der Leber als auch des Muskels bei Fütterung mit Eiweiss-Fettdiät eine deutlichere Abnahme als bei kohlehydratreicher gemischter Kost zeigt, aber die Blutzuckersteigerung bei subkutaner Verabreichung des Adrenalins bei Eiweiss-Fettdiät eher stärker und länger dauernd als bei gemischter Kost ausfällt, dass also zwischen der Hyperglykämie nach Adrenalin und dem Glykogenbestand des Organismus kein direkter Parallelismus im quantitativen Sinne des Wortes nachzuweisen ist.

Wie ist denn die Wirkung des Adrenalins bei Hunger, der in Verarmung des Kohlehydrates der Eiweiss-Fettdiät ähnlich ist?

Über die Adrenalinhyperglykämie bei Hungerkaninchen sind die bisherigen Angaben ziemlich zahlreich. Nach Yoshida (1930) fällt die Adrenalinhyperglykämie bei der überwiegenden Mehrzahl der Kaninchen in hochgradigem Hungerzustande (9–20 Tage) deutlich geringer aus als bei Normaltieren.

Andererseits fand Bang (1913) aber, dass auch bei Hungerkaninchen, deren Glykogendepots eine deutliche Abnahme zeigen, noch Hyperglykämie nach Adrenalin in fast gleichem Masse ausgelöst werden kann, wie bei gefütterten, was auch Asakawa

* Die vorliegende Mitteilung wurde Anfang April 1934 in der Japan. Gesellschaft für innere Medizin in Tokyo öffentlich vorgetragen).

(1920), Oka (1922), Markowitz (1925), Ohara (1925), Kinoshita (1926), Susaki (1926) etc. bestätigen.

Diese Abweichung der Versuchsergebnisse ist m. E. wesentlich auf die Verschiedenheit der Untersuchungsbedingungen zurückzuführen.

Die vorliegende Arbeit hat den Zweck, den Einfluss des Hungers auf die hyperglykämisierende Wirkung des Adrenalins und die Beziehung zwischen dieser Wirkung und dem Glykogenbestand des Organismus eingehend zu studieren, und gleichzeitig den Einfluss der Fettdiät auf die Hyperglykämie nach Adrenalinzufuhr zu beobachten.

I. ÜBER DEN BLUTZUCKER.

Zehn gesunde, männliche ausgewachsene Hunde (zwei Gruppen) von verschiedenen Rassen wurden zuerst mit kohlehydratreicher gemischter Kost genährt, dann eine gewisse Zeit lang dem Fasten ausgesetzt. In jeder Ernährungsperiode wurde den Tieren mit einem gewissen Intervall 0.15 ccm 0.1%ige Adrenalinlösung, Sankyo (0.15 mg) pro kg Körpergewicht subkutan am Rücken wie bei der I. Mitteilung eingespritzt, und die danach eintretende Blutzuckersteigerung halbstündlich bis zu fünf Stunden lang untersucht, indem der Blutzuckergehalt nach Hagedorn-Jensen (1923) bestimmt wurde. Dabei wurde der Versuch bei gemischter Nahrung regelmässig mit 24-stündiger Karenzzeit ausgeführt.

Wie die Tabelle I (a und b) zeigt, tritt in allen Fällen ausnahmslos die Hyperglykämie nach einwöchigem Hunger auffallend stärker und länger dauernd zutage, als bei kohlehydratreicher Ernährung. Und in dem meisten Fällen scheint der maximale Blutzuckerwert bei ersterer Bedingung mehr oder weniger später erreicht zu werden als bei letzterer.

Diese Erscheinung bei Hunger ähnelt dem Befunde bei Ernährung mit Eiweiss-Fett in der I. Mitteilung, und scheint deutlicher zum Vorschein zu kommen, als bei Eiweiss-Fettdiät.

Darauf wurde den Tieren in dem noch weiter dauernden Hungerzustande mit einem Intervall von mindestens 4 Tagen dieselbe Dosis Adrenalin wiederholt eingespritzt und die danach

eintretende Blutzuckersteigerung wie oben untersucht.

Wenn auch bei 2 Tieren—Nr. 66 und 102—ausnahmsweise die Adrenalinhyperglykämie vorübergehend stärker als bei einwöchigem Fasten zutage trat, im allgemeinen flachte die hyperglykämische Kurve nach und nach ab, um sich der Höhe in der Periode gemischter Kost zu nähern, ohne aber innerhalb der zweiwöchigen Beobachtungszeit mit drei Ausnahmen (Nr. 56, 71 und 73) den Anfangswert zu erreichen.

Nach zweiwöchiger Fastenzeit, wo die nach achttägigem Fasten gesteigerte Adrenalinhyperglykämie abzustiegen begann, wurden fünf von den zehn Hungerhunden (Nr. 69, 71, 73, 76 und 103) ausschliesslich mit 60 Kal. pro kg Körpergewicht Schweineschmalz gefüttert und bekamen mit Intervallen von 4 Tagen nach 24-stündigem Fasten die gleiche Menge Adrenalin, um die dadurch hervorgerufene Blutzuckersteigerung zu untersuchen.

Wie in der Tabelle I (b) ersichtlich ist, kommt die bis dahin allmählich absteigende hyperglykämisierende Wirkung des Adrenalins ausnahmslos wieder auffallend stärker zum Vorschein. Aber ausser 2 Tieren (Nr. 76 und 103) scheint ihre Stärke etwas kleiner als bei achttägigem Hunger zu sein.

Wenn man nun die ganzen Versuchsergebnisse zusammenfassend betrachtet, so ist leicht zu ersehen, dass der erwähnte Befund von Bang, Asakawa etc. bei relativ kurzfristigem Hunger in Erscheinung tritt, während der von Yoshida bei fortgeschrittener Karenzzeit zum Vorschein kommt.

II. ÜBER DAS GLYKOGEN.

In der I. Mitteilung wurde angegeben, dass zwischen der Hyperglykämie nach Adrenalin und dem Glykogenbestand des Organismus kein direkter Parallelismus im quantitativen Sinne des Wortes nachzuweisen ist. Bei dem vorliegenden Versuch wurde der Glykogenegehalt sowohl der Leber als auch des Muskels bei den erwähnten verschiedenen Ernährungsperioden vergleichend untersucht, um zu sehen, in welchem Verhältnis die Glykogendepots des Organismus zur Reaktion auf Adrenalin stehen.

Andere siebzehn Hunde wurden genau um den Zeitpunkt, wo

TABELLE

Nr. des Hundes ♂	Körpergewicht (kg)	Datum	Nahrung	Dosis des Adrenalins 0.15 mg pro kg Körpergewicht
		(1932)		
56	5.00	6/VI	gemischte Kost	6.75
	4.10	13/ „	6-12/VI Hunger	0.61
	4.05	17/ „	13-16/ „ „	0.60
	3.65	21/ „	17-20/ „ „	0.55
	3.20	25/ „	21-24/ „ „	0.48
64	8.20	12/IX	gemischte Kost	1.25
	6.90	19/ „	12-18/IX Hunger	1.03
	6.50	23/ „	19-22/ „ „	0.98
	6.10	27/ „	23-26/ „ „	0.91
66	9.80	26/IX	gemischte Kost	1.47
	8.30	3/X	26/IX-2/X Hunger	1.25
	7.65	7/ „	3- 6/X „	1.14
	6.90	11/ „	7-10/ „ „	1.03
	6.20	14/ „	11-13/ „ „	0.93
		(1933)		
101	7.50	29/V	gemischte Kost	1.13
	6.50	5/VI	29/V-4/VI Hunger	1.00
	6.05	9/ „	5- 8/VI „	0.90
	5.60	13/ „	9-12/ „ „	0.85
	5.15	17/ „	13-16/ „ „	0.80
	4.85	20/ „	17-19/ „ „	0.72
102	9.05	30/V	gemischte Kost	1.40
	7.85	6/VI	30/V-5/VI Hunger	1.20
	7.15	10/ „	6- 9/VI „	1.10
	6.70	14/ „	10-13/ „ „	1.00
	6.35	18/ „	14-17/ „ „	0.95
	5.95	22/ „	18-21/ „ „	0.90

I (a.).

Vor der Injektion	Blutzuckergehalt (%)							Blutzucker- gehalt vor d. Injektion (A)	Maximaler Blutzucker- gehalt (B)	Hyper- glykämischer Quotient B/A
	½ St.	1 St.	1½ St.	2 St.	3 St.	4 St.	5 St.			
	nach der Injektion									
0.084	0.118	0.145	0.153	0.154	0.119	0.116	0.105	0.084	0.154	1.83
0.063	0.090	0.100	0.125	0.144	0.157	0.172	0.138	0.063	0.172	2.73
0.057	0.071	0.079	0.092	0.097	0.097	0.091	0.086	0.057	0.097	1.71
0.049	0.055	0.069	0.077	0.085	0.085	0.095	0.091	0.049	0.095	1.94
0.093	0.107	0.113	0.133	0.127	0.121	0.097	0.081	0.093	0.133	1.43
0.067	0.089	0.095	0.090	0.086	0.083	0.079	0.077	0.067	0.095	1.42
0.078	0.084	0.116	0.145	0.160	0.163	0.144	0.139	0.078	0.163	2.09
0.075	0.109	0.115	0.122	0.140	0.151	0.146	0.118	0.075	0.151	2.01
0.086	0.092	0.112	0.118	0.144	0.152	0.138	0.115	0.086	0.152	1.77
0.082	0.094	0.096	0.103	0.093	0.100	0.090	0.092	0.082	0.103	1.26
0.081	0.095	0.124	0.158	0.173	0.214	0.163	0.127	0.081	0.214	2.64
0.097	0.140	0.157	0.184	0.200	0.238	0.270	0.263	0.097	0.270	2.78
0.095	0.109	0.119	0.126	0.132	0.154	0.149	0.143	0.095	0.154	1.62
0.079	0.114	0.108	0.109	0.121	0.113	0.114	0.106	0.079	0.121	1.53
0.078	0.087	0.124	0.127	0.131	0.120	0.106	0.099	0.078	0.131	1.68
0.070	0.096	0.125	0.163	0.220	0.254	0.235	0.226	0.070	0.254	3.63
0.061	0.078	0.105	0.125	0.163	0.179	0.179	0.181	0.061	0.181	2.97
0.073	0.088	0.100	0.125	0.144	0.186	0.218	0.231	0.073	0.231	3.16
0.071	0.098	0.112	0.117	0.124	0.151	0.183	0.189	0.071	0.189	2.66
0.075	0.082	0.084	0.099	0.118	0.123	0.141	0.146	0.075	0.146	1.95
0.090	0.106	0.117	0.106	0.105	0.101	0.099	0.105	0.090	0.117	1.30
0.074	0.107	0.127	0.152	0.172	0.194	0.190	0.149	0.074	0.194	2.62
0.070	0.099	0.131	0.161	0.183	0.208	0.210	0.177	0.070	0.210	3.00
0.063	0.096	0.130	0.164	0.184	0.199	0.180	0.170	0.063	0.199	3.16
0.064	0.091	0.115	0.131	0.129	0.129	0.129	0.122	0.064	0.131	2.05
0.079	0.109	0.130	0.148	0.155	0.177	0.180	0.155	0.079	0.180	2.28

TABELLE

Nr. des Hundes ♂	Körper- gewicht (kg)	Datum	Nahrung	Dosis des Adrena- line 0.15 mg pro kg Körper- gewicht
		(1932)		
69	7.10	4/XI	gemischte Kost	1.06
	5.85	11/ „	4-10/XI Hunger	0.87
	5.35	15/ „	11-14/ „	0.80
	4.90	19/ „	15-18/ „	0.74
	4.90	23/ „	20-22/ „ Fett-Kost	0.74
	4.70	27/ „	24-26/ „ „ „	0.70
	4.55	1/XII	28-30/ „ „ „	0.68
	6.10	8/XI	gemischte Kost	0.91
71	4.60	15/ „	8-14/XI Hunger	0.70
	4.20	19/ „	15-18/ „	0.63
	4.10	23/ „	19-22/ „	0.63
	3.90	27/ „	24-26/ „ Fett-Kost	0.60
	5.95	18/ „	gemischte Kost	0.89
73	4.40	25/ „	18-24/XI Hunger	0.66
	4.10	29/ „	25-28/ „	0.62
	3.70	3/XII	29/XI-2/XII „	0.55
	3.55	7/ „	4-6/XII Fett-Kost	0.53
	7.10	13/ „	gemischte Kost	1.06
76	6.00	20/ „	13-19/XII Hunger	0.90
	6.10	24/ „	20-23/ „	0.91
	5.15	28/ „	24-27/ „	0.77
		(1933)		
103	5.30	1/I	29-31/XII(1932) Fett-Kost	0.80
	4.95	5/ „	1-4/I (1933) „ „	0.74
	9.15	5/VI	gemischte Kost	1.40
	7.25	12/ „	5-11/VI Hunger	1.00
	6.85	16/ „	12-15/ „	1.00
	6.75	20/ „	16-19/ „	1.00
	6.90	24/ „	21-23/ „ Fett-Kost	1.10

I (b).

Vor der Injektion	Blutzuckergehalt (%)							Blutzucker- gehalt vor d. Injektion (A)	Maximaler Blutzucker- gehalt (B)	Hyper- glykämischer Quotient B/A
	½ St.	1 St.	1½ St.	2 St.	3 St.	4 St.	5 St.			
	nach der Injektion									
0.086	0.092	0.108	0.108	0.103	0.102	0.100	0.095	0.086	0.108	1.26
0.069	0.072	0.099	0.119	0.177	0.229	0.215	0.162	0.069	0.229	3.32
0.076	0.088	0.099	0.115	0.153	0.180	0.176	0.143	0.076	0.180	2.37
0.086	0.105	0.126	0.171	0.215	0.232	0.223	0.200	0.086	0.232	2.70
0.074	0.103	0.124	0.163	0.188	0.220	0.214	0.192	0.074	0.220	2.97
0.096	0.127	0.163	0.209	0.231	0.275	0.294	0.243	0.096	0.294	3.06
0.090	0.103	0.144	0.163	0.178	0.175	0.174	0.131	0.090	0.178	1.98
0.079	0.102	0.116	0.166	0.207	0.234	0.191	0.162	0.079	0.234	2.96
0.076	0.093	0.098	0.134	0.124	0.120	0.107	0.079	0.076	0.134	1.76
0.072	0.087	0.111	0.134	0.168	0.170	0.159	0.120	0.072	0.170	2.50
0.079	0.082	0.093	0.116	0.122	0.131	0.122	0.101	0.079	0.131	1.68
0.078	0.099	0.118	0.160	0.201	0.230	0.220	0.187	0.078	0.230	2.95
0.102	0.115	0.140	0.176	0.184	0.223	0.224	0.201	0.102	0.224	2.20
0.096	0.105	0.120	0.128	0.130	0.131	0.135	0.113	0.096	0.135	1.46
0.091	0.131	0.147	0.164	0.184	0.191	0.196	0.169	0.091	0.196	2.15
0.085	0.093	0.095	0.103	0.108	0.131	0.135	0.116	0.085	0.135	1.59
0.077	0.090	0.106	0.132	0.203	0.231	0.225	0.205	0.077	0.231	3.00
0.074	0.085	0.095	0.114	0.125	0.139	0.148	0.146	0.074	0.148	2.00
0.056	0.065	0.074	0.100	0.104	0.122	0.124	0.103	0.056	0.124	2.21
0.065	0.078	0.095	0.131	0.159	0.186	0.195	0.199	0.065	0.199	3.06
0.108	0.173	0.222	0.258	0.290	0.267	0.254	0.232	0.108	0.290	2.69
0.081	0.088	0.105	0.105	0.094	0.087	0.076	0.081	0.081	0.105	1.29
0.069	0.086	0.107	0.133	0.167	0.202	0.189	0.131	0.069	0.202	2.93
0.056	0.083	0.100	0.105	0.110	0.119	0.127	0.082	0.056	0.127	2.26
0.053	0.065	0.073	0.085	0.092	0.092	0.098	0.085	0.053	0.098	1.85
0.032	0.050	0.065	0.081	0.085	0.092	0.097	0.107	0.032	0.107	3.35

Adrenalin eingespritzt werden sollte, durch künstliche Luftembolie getötet, und so schnell wie möglich der Glykogengehalt der Leber und des Muskels (*Quadriceps femoris*) nach Mori-Iwasaki (1922) bestimmt. Die Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle II gezeigt.

Wie die Tabelle zeigt, ist der Glykogengehalt sowohl der Leber als auch des Muskels nach achttägigem Hunger deutlich geringer als bei gemischter Kost, und scheint er nach zweiwöchigem Fasten mehr oder weniger weiter abzunehmen, aber nach weiterer vier-tägiger Karenzzeit bleibt der Wert annähernd gleich. Zwischen dem Gehalt, der nach drei Tagen Fettdiät nach zweiwöchiger Hungerzeit gefunden wurde, und dem nach vierzehntägigem Fasten ist kein ausgesprochener Unterschied zu konstatieren.

Der oben beschriebene Befund, dass die hyperglykämisierende Wirkung des Adrenalins nach über eine Woche lang dauerndem Hunger allmählich sich abschwächt, beruht also nicht auf Verarmung des Glykogendepots. Andererseits kann man nicht erkennen, dass die verstärkte Wirkung des Adrenalins bei Fettdiät nach Hunger durch Vermehrung des Glykogens verursacht würde.

Takakusu (1924), Hisajima (1925) und Ide (1930) fanden, dass wenn man eine relativ grosse Menge von Adrenalin in steigender Dosis dem Kaninchen jeden Tag wiederholt injiziert, man eine histologisch nachweisbare Veränderung an den sympathischen Nervenzellen nachweisen kann. Wenn auch in meinem Versuche die Menge des Adrenalins viel geringer ist und ein Intervall von vier Tagen zwischen jeder Injektion eingeschaltet wird, kann ich nicht ausschliessen, dass dabei keine Funktionsstörung im Gebiete des sympathischen Nervensystems stattfindet. Die Frage, wie die durch Fasten einmal abgeschwächte hyperglykämisierende Wirkung des Adrenalins wieder durch Aufnahme von Fett stärker zum Vorschein kommt, bleibt vorläufig noch offen.

ZUSAMMENFASSUNG.

Die Blutzuckersteigerung nach Adrenalininjektion fällt bei eine Woche langem Hunger ausnahmslos eher stärker und länger dauernd aus, als bei Normaltieren, und bei ersteren kommt der maximale Blutzuckerwert meistens dabei etwas später zum Vor-

schein, als bei letzteren. Wenn der Hunger noch länger dauert, so schwächt sich die hyperglykämisierende Wirkung des Adrenalins mit der Zeit ab. Wenn dabei den Tieren Fettdiät geboten wird, so tritt dieselbe Wirkung wieder auffallend stärker zutage, ist aber nicht so deutlich wie bei eine Woche dauerndem Hunger.

Der Glykogengehalt sowohl der Leber als auch des Muskels nimmt bis zu einwöchiger Hungerzeit deutlich ab, aber bei weiterer Karenzzeit bleibt der Wert praktisch unverändert, selbst wenn nach zweiwöchigem Fasten einige Tage reichlich Fett gegeben wird, wobei die genannte Adrenalinwirkung, wie gesagt, wieder stärker zum Vorschein kommt.

Deshalb kann man also sicher sagen, dass zwischen der Hyperglykämie nach Adrenalin und dem Glykogenbestand des Organismus kein direkter Parallelismus im quantitativen Sinne des Wortes nachzuweisen ist, was oben bei Eiweiss-Fettdiät erwähnt wurde. Die Ursache der Verstärkung der Adrenalinwirkung bei Eiweiss-Fettdiät oder Hunger (d. h. kohlehydratarmer Nahrung) muss folgerichtig in einer anderen Richtung gesucht werden.

Nachträglich wurde ein Teil der Leber, die für die Bestimmung des Glykogengehaltes gebraucht wurde, mit Sudan III gefärbt, und pathologisch-histologisch untersucht. Die rot gefärbten Fetttröpfchen in dem Leberparenchym sind bei einwöchigem Hunger an Zahl sehr gering und bei zweiwöchigem Fasten etwas zahlreich. Bei drei Tagen Fettdiät nach zweiwöchigem Hunger wird das Fett in grösserer Menge vorgefunden als bei einwöchigem Hunger und ist dem bei zweiwöchigem Hunger fast gleich. Man kann also einen gewissen Schluss über die Beziehung zwischen dem Fettgehalt des Leberparenchyms und der erwähnten Adrenalinwirkung nicht finden.

Zum Schlusse erfülle ich die angenehme Pflicht, Herrn Prof. N. Kageura, auf dessen Veranlassung diese Arbeit zustande gekommen ist, für seine Leitung und Unterweisung und Herrn Prof. K. Inouye am hiesigen pathologischen Institut für seinen freundlichen Beistand meinen ergebensten Dank auszusprechen.

TABELLE II.

K.G. Körpergewicht
 Adr. Adrenalin (mg)

Datum	Nr. des Hundes ♂	Körper- gewicht (kg)	Nahrung	Blut- zucker- gehalt (%) vor der Tötung	Leber- gewicht (g)	Glykogengehalt (%)	
						der Leber	des Muskels
(1931) 7/XII	14	9.35	gemischte Kost " " " " " " " "	0.095	338.5	2.90	2.12
8/ "	13	5.50		0.067	235.5	3.84	2.32
10/ "	8	8.15		0.094	277.0	3.05	2.05
11/ "	16	5.10		0.095	249.5	4.50	2.75
(1932) 2/II	27	6.80		0.095	311.5	1.15	0.81
				im Mittel	3.08	1.97	
(1933) 18/VII	111	6.20	gemischte Kost 11/VII Hunger	0.085	155.0	0.70	0.54
18/VII	112	2.70	gemischte Kost 11/VII Hunger	0.057	87.0	0.56	0.47
18/VII	113	6.20	gemischte Kost 11/VII Hunger	0.080	145.0	0.83	0.75
28/X	137	7.40	gemischte Kost 21/X Hunger	0.144	451.0	0.70	0.58
7/XI	141	8.50	gemischte Kost 31/X Hunger	0.079	317.0	0.56	0.52
7/XI	142	5.20	gemischte Kost 31/X Hunger	0.079	161.0	0.65	0.65
				im Mittel	0.67	0.58	

26/VII	114	3.50	11-17/VIII 18-21/ " " " "	gemischte Kost Hunger	11/VII 18/ " " " "	K.G. 6.0 kg Adr. 0.69 K.G. 4.4 kg Adr. 0.66 K.G. 3.8 kg Adr. 0.57	0.062	129.0	0.47	0.43
26/VII	115	2.70	22-25/ " " " "	gemischte Kost Hunger	11/VII 18/ " " " "	K.G. 4.2 kg Adr. 0.63 K.G. 3.2 kg Adr. 0.48 K.G. 2.6 kg Adr. 0.43	0.047	105.0	0.47	0.43
15/VIII	118	10.80	22-25/ " " " "	gemischte Kost	31/VII	K.G. 14.1 kg Adr. 2.10	0.047	283.0	0.56	0.52
			31/VIII- 6/VIII	Hunger	7/VIII	K.G. 12.1 kg Adr. 1.80				
			7-10/VIII	" "	11/ "	K.G. 11.7 kg Adr. 1.75				
			11-14/ "	" "			im Mittel	0.50		0.46
2/X	116	4.80	12-18/IX 19-22/ " " " "	gemischte Kost Hunger	12/IX 19/ " " " "	K.G. 6.6 kg Adr. 0.99 K.G. 5.7 kg Adr. 0.85 K.G. 5.5 kg Adr. 0.82	0.084	156.0	0.50	0.45
2/X	122	5.00	23-26/ " " " "	" "	27/ "	K.G. 4.95 kg Adr. 0.75				
			27/IX-1/X	gemischte Kost	12/IX	K.G. 7.2 kg Adr. 1.08	0.082	176.0	0.45	0.38
			12-18/IX	Hunger	19/ "	K.G. 5.5 kg Adr. 0.82				
			19-22/ "	" "	23/ "	K.G. 5.3 kg Adr. 0.79				
			23-26/ "	" "	27/ "	K.G. 4.9 kg Adr. 0.73				
2/X	123	6.80	27/IX-1/X	gemischte Kost	12/IX	K.G. 10.5 kg Adr. 1.57	0.084	214.0	0.67	0.47
			12-18/IX	Hunger	19/ "	K.G. 8.4 kg Adr. 1.26				
			19-22/ "	" "	23/ "	K.G. 7.45 kg Adr. 1.17				
			23-26/ "	" "	27/ "	K.G. 7.05 kg Adr. 1.00				
			27/IX-3/X	gemischte Kost	19/IX	K.G. 10.6 kg Adr. 1.58	0.080	275.0	0.68	0.59
9/X	125	7.15	19-25/IX	Hunger	26/ "	K.G. 8.95 kg Adr. 1.34				
			26-29/ "	" "	30/ "	K.G. 8.2 kg Adr. 1.20				
			30/IX-1/X	" "	4/X	K.G. 8.05 kg Adr. 1.20				
			4-8/X	" "			im Mittel	0.58		0.47

TABELLE II (Fortsetzung).

Datum	Nr. des Hundes gewicht (kg)	Nahrung	Blut- zucker- gehalt (%) vor der Tötung	Leber- gewicht (g)	Glykogeengehalt (%)	
					der Leber	des Muskels
29/VIII	124	4.30				
		gemischte Kost 10/VIII K.G. 8.6kg Adr. 1.29	0.107	169.0	0.59	0.47
		10-16/VIII Hunger 17/ " K.G. 7.1kg Adr. 1.06				
		17-20/ " " 21/ " K.G. 6.4kg Adr. 0.96				
		21-24/ " " 25/ " K.G. 4.8kg Adr. 0.72				
		26-28/ " Fett-Kost				
10/X	127	7.00				
		gemischte Kost 21/IX K.G. 10.0kg Adr. 1.50	0.061	240.0	0.56	0.56
		21-27/IX Hunger 28/ " K.G. 8.65kg Adr. 1.30				
		28/IX-1/X " 2/X K.G. 7.95kg Adr. 1.20				
		2-5/X " 6/ " K.G. 7.7kg Adr. 1.15				
		Fett-Kost				
10/X	128	3.80				
		gemischte Kost 21/IX K.G. 6.5kg Adr. 0.87	0.079	91.0	0.63	0.47
		21-27/IX Hunger 28/ " K.G. 5.2kg Adr. 0.80				
		28/IX-1/X " 2/X K.G. 4.8kg Adr. 0.72				
		2-5/X " 6/ " K.G. 4.7kg Adr. 0.71				
		Fett-Kost				
10/X	129	6.60				
		gemischte Kost 21/IX K.G. 9.1kg Adr. 1.36	0.076	169.0	0.75	0.56
		21-27/IX Hunger 28/ " K.G. 8.0kg Adr. 1.20				
		28/IX-1/X " 2/X K.G. 7.5kg Adr. 1.12				
		2-5/X " 6/ " K.G. 7.0kg Adr. 1.00				
		Fett-Kost				
			im Mittel		0.63	0.51

LITERATUR.

- Asakawa, O. (1920): Mitteil. d. med. Fakul. d. Kaiserl. Universität zu Tokyo, **25**, 539.
- Bang, I. (1913): Der Blutzucker, Wiesbaden.
- Hagedorn, H. C. und B. Norman Jensen (1923): Biochem. Zeitschr., **135**, 46.
- Hisajima, T. (1925): Nisshin Igaku, **15**, 29.
- Ide, M. (1930): Nagasaki Igakkwai Zassi (Organ der Nagasaki Med. Gesellsch.), **8**, 421.
- Iwasaki, T. u. Mori, M. (1922): zit. n. Suto, Praktikum d. physiol. Chemie, 11. Aufl. Tokyo, 234.
- Kinoshita, T. (1926): Nippon Naika Gakkai Zasshi (Mitteil. d. japan. Gesellsch. f. inn. Med.), **14**, 443.
- Markowitz, J. (1925): Amer. Journ. Physiol., **74**, 22.
- Ohara, T. (1925): Tohoku Journ. exp. Med., **6**, 1 u. 23.
- Oka, T. (1922): ebenda **3**, 206.
- Susaki, K. (1926): La Iji-Sinbun, Nr. 1201, 1443.
- Takakusu, R. (1924): Nisshin Igaku, **14**, 71.
- Yoshida, K. (1930): Buletano de la Jurmedica Instituto de la Medicina Fakultato de Nagasaki, **2**, 132.
- Yoshio, K. (1933): Journ. of Biochem., **17**, 11.

ÜBER DIE VORGÄNGE DER ACETONKÖRPER- BILDUNG IN DER MAGENWAND.

II. Mitteilung. Bei Hunger.

VON

NAGAO TSURU.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik zu Nagasaki, Japan.
Direktor: Prof. N. Kageura.)

(Eingegangen am 15. Januar 1937).

Beim Studium des Magensaftes entdeckte mein College Ikebe (1933), dass Acetonkörper immer als ein normaler Bestandteil desselben vorhanden sind. Weiter stellte er fest, dass das 1-Leucin in der Magenwand durch Durchblutung des Magens abgebaut wird, um Acetonkörper zu bilden, welche sich teilweise auch im Magensaft vorfinden. Bald darauf (1933) konnte ich in Durchblutungsversuchen des Magens nachweisen, dass die Fettsäuren in der Magenwand in Acetonkörper umgewandelt werden. Als Ergebnis war es sehr merkwürdig, dass nur Fettsäuren mit gerader Anzahl von C-Atomen Acetonkörper liefern, wogegen im Versuche mit Fettsäuren mit ungerader Anzahl von C-Atomen niemals Acetonkörperbildung beobachtet wurde. Die obigen Ergebnisse gelten bei Gesundheitszustand.

Was die Literatur über den Acetonkörperstoffwechsel bei Hunger betrifft, wäre Folgendes zu erwähnen. Seit langer Zeit wurden wie bekannt die Ketonkörper im Menschen beim Hungerzustand in ihrer Menge vermehrt vorgefunden: es lag sogenannte Hungerhyperketonämie vor. Bei Kaninchenversuchen wurde das Blutaceton bei Hunger bekanntlich von einigen Forschern vermehrt vorgefunden, dagegen beobachtete Murakami (1934), dass das Blutaceton des Kaninchens mehr in den ersten Hungertagen und weniger im weiteren Verlauf des Hungers als beim Gesundheitszustand vorgefunden wird. Auch bei Hundeversuchen nimmt das Harnaceton bei Hunger im allgemeinen wie bekannt zu, aber nach

Hammarsten (1921) vermindert es sich allmählich im Verlauf des Hungers.

Dementsprechend, wie manche Autoren annehmen wollen, dürfte auch der Acetonkörperstoffwechsel im Organismus bei Hunger verschieden sein, bald grösser, bald kleiner. Also wollte ich ausfindig machen, wie im Hundemagen der Vorgang der Acetonkörperbildung vom Hunger beeinflusst wird. Ich beschloss dieses Problem experimentell zu behandeln, weil dies unerlässlich ist, sowohl um den Chemismus des Magens, als auch den Acetonkörperstoffwechsel selbst im Organismus zu studieren.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Zum Versuche wurde 8–14 Tage ausgehungelter Hundemagen gebraucht. Defibriertes Blut 300 ccm wurde durchströmt. Die Durchblutung dauerte 3 Stunden lang. Die Durchblutungsmethode entsprach ganz genau der von Yoshida und Matsuoka (1933). Aceton, Acetessigsäure und β -Oxybuttersäure wurden nach der Mikrobestimmungsmethode von Takahata und Kume untersucht.

Das Blut, zu welchem keine Muttersubstanz des Acetonkörpers (z.B. Fettsäure oder einige Aminosäuren) hinzugefügt war, wurde

Kontrollversuche 1.

TABELLE I.
(Kontrollversuch 1.)

Hunger- dauer		Aceton (in mg%)	Acetessig- säure (in mg% 7)	β -Oxy- buttersäure (in mg%)	in Aceton) umge- rechnet (in mg%)
1. 14 Tage	Vorblut	17.07	8.06	11.87	28.27
	Nachblut	8.54	6.06	13.75	16.95
2. 10 Tage	Vorblut	0.85	14.61	5.02	11.99
	Nachblut	0.85	4.03	5.02	5.94
3. 8 Tage	Vorblut	2.73	9.36	8.26	12.77
	Nachblut	2.92	3.05	4.01	6.90
Durchschnitt	Vorblut	6.88	10.67	8.38	17.67
	Nachblut	4.10	4.56	7.59	9.93
Beim Gesund- zustand	Vorblut	2.35	14.85	4.53	12.95
	Nachblut	2.22	5.28	4.44	7.85

durch die Magenwand des Hungerhundes durchgeströmt. Wenn man den Acetonkörper im Blute nach Durchblutung mit dem Vorblute vergleicht, so ergibt sich, dass sich Aceton und β -Oxybuttersäure nach der Durchströmung bald vermehrten, bald verminderten, wogegen sich der Wert der Acetessigsäure von 10.67 mg% nach der Durchblutung bis auf 4.56 mg% durchschnittlich verminderte. Der Wert des gesamten Acetons, wobei die Acetessigsäure und β -Oxybuttersäure in Aceton umgerechnet wurden, stieg von 17.67 mg% im Vorblute bis auf 9.93 mg% ab. Bei Hundhunden bereits beobachtete ich, dass durch Durchblutung der Acetonkörper im Blute herabgesetzt wurde. Es ging nämlich der Acetonkörper durch die Durchblutung beträchtlich verloren. Der Verminderungsgrad des Acetonwertes wurde höher beim Hungerhunde als beim Hundhunde vorgefunden.

Kontrollversuche 2.

TABELLE II.
(Kontrollversuch 2.)

Hungerdauer		Aceton (in mg%)	Acetessigsäure (in mg%)	β -Oxybuttersäure (in mg%)	in Aceton umgerechnet (in mg%)
1.	Vorblut	4.32	2.87	6.38	9.51
	Nachblut	2.68	2.20	8.50	8.67
2.	Vorblut	2.66	2.66	18.75	14.60
	Nachblut	4.66	4.21	12.08	13.80
Durchschnitt	Vorblut	3.49	2.76	12.56	12.05
	Nachblut	3.67	3.20	10.29	11.23

Um die Kontrollversuche noch vollständiger zu bestätigen, wurde das Blut des Hundhundes durch das Durchblutungspräparat ohne Magen mit Buttersäure 3 Stunden lang durchgeströmt. Dabei verminderte sich durchschnittlich nach Durchblutung der Wert des Acetonkörpers im Blute wie tabellarisch angegeben. Diese Tatsache und die Resultate in der I. Mitteilung zeigten uns, dass die quantitative Vermehrung des Acetonwertes beim Hundhunde nicht im durchströmten Blute, sondern nur in der Magen-

wand gewonnen worden war.

HAUPTVERSUCHE

1. Durchblutungsversuche mit Fettsäuren mit gerader Anzahl von C-Atomen.

a) Buttersäure(C₄)

TABELLE III.
(Buttersäure C₄).

Hunger- dauer		Aceton (in mg%)	Acetessig- säure (in mg%)	β -Oxy- buttersäure (in mg%)	in Aceton umge- rechnet (in mg%)
1. 8 Tage	Vorblut	5.80	9.53	4.16	13.53
	Nachblut	2.25	5.83	4.58	8.42
2. 8 Tage	Vorblut	3.24	9.40	12.48	15.54
	Nachblut	2.90	6.60	10.00	12.22
3. 12 Tage	Vorblut	3.58	9.16	15.03	17.17
	Nachblut	3.74	5.50	18.95	17.41
Durchschnitt	Vorblut	4.20	9.36	10.55	15.41
	Nachblut	3.96	3.97	11.17	12.68
Beim Gesund- zu stand	Vorblut	2.63	4.29	5.61	6.68
	Nachblut	2.24	10.21	3.42	9.81

1g Buttersäure wurde mit Natriumcarbonatlösung neutralisiert und dem durchströmten Blute des Hungerhundes zugesetzt. Durch Durchblutung des Magens blieb die Menge der β -Oxybuttersäure im Nachblute und Vorblute unverändert, während die Menge der Acetessigsäure im Blute deutlich vermindert vorgefunden wurde. Das Resultat war fast gleich wie im Kontrollversuche.

b) Kaprylsäure(C₈)

1g Kaprylsäure wurde neutralisiert und dem Blute zugesetzt. In diesen Versuchen wurde das Aceton im Nachblute mehr als im Vorblute vorgefunden. Aber die Acetessigsäure im 1. und 3. Versuche und die β -Oxybuttersäure im 2. Versuche waren vermindert, demnach stieg das gesamte Aceton durch die Durchblutung ab. In dem Versuche, bei dem Gesundhunde gebraucht wurden, wurde das gesamte Aceton in Blute durch die Durchblutung deutlicher verloren, wenn man die Magenwand des Hungerhundes

TABELLE IV.
(Kaprylsäure C₈)

Hunger- dauer		Aceton (in mg%)	Acetessig- säure (in mg% 7)	β -Oxy- buttersäure (in mg%)	in Aceton umge- rechnet (in mg%)
1. 9 Tage	Vorblut	0.58	13.36	0.83	8.64
	Nachblut	1.02	2.56	1.04	8.06
2. 9 Tage	Vorblut	1.87	6.23	13.33	12.84
	Nachblut	2.04	7.33	4.16	8.53
3. 10 Tage	Vorblut	1.65	16.09	5.97	14.13
	Nachblut	5.46	1.46	1.82	7.31
Durchschnitt	Vorblut	1.36	11.89	6.70	11.87
	Nachblut	2.87	3.78	2.34	6.38
Beim Gesund- zustand	Vorblut	3.24	7.39	3.11	9.23
	Nachblut	5.69	7.69	2.06	11.23

mit einigen Fettsäuren durchströmte.

2. Durchblutungsversuche mit ungerader Anzahl
von C-Atomen.

c) Valeriansäure (C₅)

1 g Valeriansäure wurde neutralisiert und dem Blute zugesetzt. Durch die Durchblutung des Magens verminderte sich der Acetonkörper im Blute mit Ausnahme der β -Oxybuttersäure, deren durchschnittlicher Wert im Nachblute fast gleich dem im Vorblute vorgefunden wurde. Aber das gesamte Aceton im Blute stieg von 10,96 mg% nach der Durchblutung bis auf 8,49 mg% ab. Diese Resultate waren gleichartig denen beim Hund.

d) Heptylsäure (C₇)

1 g Heptylsäure wurde neutralisiert und dem Blute zugesetzt. Durch die Durchblutung des Magens zeigten Aceton und β -Oxybuttersäure im Blute in ihren durchschnittlichen Werten keine deutliche Veränderung. Im 1. und 3. Versuche wurde die Acetessigsäure deutlich vermindert vorgefunden. Auch im Versuche des Gesundmagens stieg der Acetonkörper deutlich nach der Durchblutung ab.

TABELLE V.
(Valeriansäure C₅).

Hunger- dauer		Aceton (in mg%)	Acetessig- säure (in mg% 7)	β -Oxy- buttersäure (in mg%)	als Aceton umge- rechnet (in mg%)
1. 8 Tage	Vorblut	1.02	4.40	2.08	4.68
	Nachblut	0.76	0.00	4.16	3.09
2. 10 Tage	Vorblut	0.85	18.60	8.75	16.30
	Nachblut	1.10	12.29	8.33	12.73
3. 10 Tage	Vorblut	4.46	2.44	10.84	11.89
	Nachblut	3.12	2.44	9.18	9.65
Durchschnitt	Vorblut	2.11	8.46	7.22	10.96
	Nachblut	1.68	4.91	7.22	8.49
Beim Gesund- stand	Vorblut	3.99	12.63	5.89	14.47
	Nachblut	3.44	6.71	6.07	10.64

TABELLE VI.
(Heptylsäure C₇).

Hunger- dauer		Aceton (in mg%)	Acetessig- säure (in mg%)	β -Oxy- buttersäure (in mg%)	als Aceton umge- rechnet (in mg%)
1. 9 Tage	Vorblut	2.36	6.78	9.45	11.48
	Nachblut	2.38	0.00	14.58	10.51
2. 14 Tage	Vorblut	3.75	2.38	11.66	11.61
	Nachblut	2.87	3.55	5.83	8.13
3. 10 Tage	Vorblut	2.73	6.23	17.50	16.03
	Nachblut	4.09	2.01	14.16	13.12
Durchschnitt	Vorblut	2.94	5.13	12.87	13.04
	Nachblut	3.11	1.85	11.52	10.58
Beim Gesund- zustand	Vorblut	9.14	12.55	9.57	21.38
	Nachblut	8.89	12.65	8.44	20.82

Im Durchblutungsversuche des Hungermagens mit Fettsäuren mit ungerader Anzahl von C-Atomen vermehrte sich das gesamte Aceton im Blute nicht, sondern nahm eher deutlich ab.

3. Durchblutungsversuche mit L-Leucin.

e) Bei Hunger.

TABELLE VII (A).
(Mit *l*-Leucin bei Hunger).

Hunger- dauer		Aceton (in mg%)	Acetessig- säure (in mg%)	β -Oxy- buttersäure (in mg%)	als Aceton umge- rechnet (in mg%)
1. 8 Tage	Vorblut	0.51	9.33	6.66	9.53
	Nachblut	2.04	8.70	3.71	9.06
2. 10 Tage	Vorblut	2.73	7.33	12.20	13.70
	Nachblut	1.53	7.33	11.00	11.82
3. 14 Tage	Vorblut	7.42	1.91	5.75	11.70
	Nachblut	5.80	1.73	6.25	10.26
Durchschnitt	Vorblut	3.55	6.19	8.20	11.64
	Nachblut	3.12	5.92	6.99	10.21

Dem durchströmten Blute wurde 0,5 g *l*-Leucin zugesetzt. Bei diesem Versuche wurde nach Durchblutung die Menge des Acetons, der Acetessigsäure und β -Oxybuttersäure im Blute immer vermindert vorgefunden. Nämlich das gesamte Aceton stieg von 11,64 mg% durch die Durchblutung bis auf 10,21 mg% ab.

Wenn man die Magenwand des Hungerhundes mit *l*-Leucin durchströmte, so wurde der Acetonkörper im Blute in seiner Menge durch die Durchblutung kaum vermehrt. Hingegen beobachtete ich wie Ikebe experimentelle den Vorgang der Acetonkörperbildung in der Magenwand des Hundes wie unten.

f) *Beim Gesundhunde mit l-Leucin.*

(B) (Mit *l*-Leucin bei Gesundheitszustand).

		Aceton (in mg%)	Acetessig- säure (in mg%)	β -Oxy- buttersäure (in mg%)	als Aceton umge- rechnet (in mg%)
1.	Vorblut	2.87	12.10	4.40	12.02
	Nachblut	3.58	11.33	7.20	14.01
2.	Vorblut	1.91	8.50	4.44	9.21
	Nachblut	3.41	9.20	5.41	11.65
2.	Vorblut	1.75	4.76	7.16	8.45
	Nachblut	2.04	5.50	8.75	10.04
Durchschnitt	Vorblut	2.18	8.45	5.33	9.89
	Nachblut	3.01	8.68	7.12	11.90

Diesmal wurde *l*-Leucin dem Gesundblut zugesetzt. In diesem Versuche wurden Aceton, β -Oxybuttersäure und das gesamte Aceton mehr im Nachblute als im Vorblute vorgefunden. Der Wert des gesamten Acetons stieg von 9,89 mg% im Vorblute bis auf 11,90 mg% im Nachblute.

Bei den Versuchen e und f beobachtete ich, dass durch Durchblutung mit *l*-Leucin-haltigem Blute nur beim Gesundhunde der Acetonkörper im Blute deutlich aufstieg.

Schlussbetrachtung.

Um die Arbeit von Ikebe nachzuprüfen, durchströmte ich die Gesundmagenwand mit *l*-Leucin, wie im Versuch f; daraufhin wurde der Acetonkörper im Nachblute vermehrt vorgefunden. Die Resultate entsprechen denen von Ikebe.

Bei anderen Versuchen wurde die Hungermagenwand mit mehreren Fettsäuren und *l*-Leucin durchströmt. Als Ergebnis verminderten sich stets die Werte des Acetonkörpers durch die Durchblutung, fast gleich wie in den Kontrollversuchen sowie in den Versuchen beim Gesundheitszustand mit Fettsäuren mit ungerader Zahl von C-Atomen.

Neulich wurde experimentell festgestellt, dass die chemischen Vorgänge der Argininspaltung in der Magenwand von Muraoka (1935) sowie der Harnsäurespaltung in der Magenwand von Tsutsui (1936) beim Hungerzustand auch deutlich herabgesetzt werden. Ferner nahmen früher manche Autoren an, dass die einzelnen Organe im Organismus im Verlauf des Hungers allmählich funktionell herabgesetzt werden. Die Arbeit von Lichtwitz gibt darüber einen dankenswerten Aufschluss; nach ihm finden sich die Schleimhäute der einzelnen Organe bei Hunger atrophisch vor, die Funktionen des Magens werden herabgesetzt und ferner wird freie Salzsäure im Magensaft kaum sezerniert.

Also dürfte man sagen, mit besonderer Betonung meiner Resultate in den Versuchen mit dem Hungermagen, dass wie manche Autoren schon früher annahmen, die Vorgänge der Acetonkörperbildung in der Magenwand bei Hunger ganz deutlich herabgesetzt werden.

III. Mitteilung. Kreuzversuche.

Früher hatten Embden und seine Mitarbeiter (1906) mitgeteilt, dass der Vorgang der Acetonkörperbildung ausschliesslich in der Leber stattfindet. Dies Problem studierten eingehend Prof. Matsuo und seine Mitarbeiter. Ikebe (1933) teilte mit, dass L-Leucin in der Magenwand den Acetonkörper bildet, welcher im Magensaft als normaler Bestandteil vorgefunden wird. Neulich stellte ich (1935) fest, dass die Fettsäure in der Magenwand des normal ernährten Tieres sich in Acetonkörper umwandelt. Dabei drückte ich die Meinung aus, dass die Vermehrung des Acetonkörpers in meinen sämtlichen Untersuchungen nicht in dem durchströmten Blute, sondern chemisch in der Magenwand zustande kommt. Aber fasst man meine Resultate bei Hunger schärfer ins Auge, so fragt es sich, ob die Herabsetzung der Acetonkörperbildung bei Hunger nur in der Magenwand oder nur im durchströmten Blute oder aber in beiden zu suchen ist. Um nun dies klar zu machen, unternahm ich weiter die folgenden Versuche: Kreuzversuche.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Die Durchblutungsmethode und Bestimmungsmethode des Acetonkörpers entsprachen ganz genau der in der I. und II. Mitteilung.

I. Versuche.

Ich durchströmte erstens die Magenwand, welche aus einem Hund exstirpiert wurde, mit der Flüssigkeit, zu welcher das Blut eines schon ausgehungerten Hundes und mit Natriumcarbonat neutralisierte 1 g Buttersäure beigemischt wurden, und bestimmte die Acetonmenge im Nachblute. Die Resultate sind tabellarisch aufgezeigt. Das gesamte Aceton vermehrte sich bedeutend gegenüber den Werten im 1. und 2. Versuche, während im 3. Versuche nach der Durchblutung der Wert des gesamten Acetons keine nennenswerte Veränderung zeigte; aber vergleichend mit den mitgeteilten Resultaten gilt der Wert im 3. Versuche nicht, so

TABELLE VIII. (Kreuzversuch 1.)

Hunger- dauer		Aceton (in mg%)	Acetessig- säure (in mg%)	β -Oxy- buttersäure (in mg%)	als Aceton umge- rechnet (in mg%)
1. 8 Tage	Vorblut	1.53	1.83	13.33	10.01
	Nachblut	1.20	9.96	14.58	13.28
2. 14 Tage	Vorblut	4.18	5.04	9.50	12.34
	Nachblut	5.33	5.04	10.04	13.79
3. 11 Tage	Vorblut	1.53	4.03	11.25	10.09
	Nachblut	2.39	1.83	9.11	10.21
Durchschnitt	Vorblut	2.41	3.63	11.36	10.81
	Nachblut	2.97	5.61	11.24	12.42

dass Acetonkörperbildung dort niemals nachgewiesen wurde.

II. Versuche.

TABELLE IX. (Kreuzversuch 2.)

Hunger- dauer		Aceton (in mg%)	Acetessig- säure (in mg%)	β -Oxy- buttersäure (in mg%)	als Aceton umge- rechnet (in mg%)
1. 8 Tage	Vorblut	2.36	6.66	6.35	9.68
	Nachblut	1.93	6.41	5.79	8.78
2. 14 Tage	Vorblut	3.62	8.12	9.04	13.27
	Nachblut	1.25	7.59	7.95	9.99
3. 11 Tage	Vorblut	1.70	1.83	7.50	6.92
	Nachblut	2.90	1.46	7.16	6.05
Durchschnitt	Vorblut	2.56	55.9	7.63	9.95
	Nachblut	2.03	5.15	5.96	8.27

Diesmal durchströmte ich die 8–14 Tage hungrige Magenwand mit 1 g Buttersäure vermischem Blute des Hundes, und bestimmte den Acetonwert. Die Resultate sind aus Tabelle ersichtlich; in sämtlichen einzelnen Fällen war die Mengenschwankung des Acetonkörpers unbestimmt, wobei sich die Acetessigsäure und β -Oxybuttersäure in ihrer Menge stets verminderten, während das gesamte Aceton auch stets abnahm. Im Durchschnitt stieg das letztere von 9.95 mg% nach der Durchblutung bis auf 8.27 mg% ab. Aus diesen Versuchsergebnissen

kommt man zum Schluss, dass in der hungrigen Magenwand keine Acetonkörperbildung stattfindet.

Schlussbetrachtung.

Wenn der hungrige Magen mit normalem Blut unter Zusatz von Muttersubstanzen des Acetonkörpers durchströmt wurde, so entstand dort keine Vermehrung des Acetonkörpers, wenn man dagegen umgekehrt den Gesundmagen mit dem Blut des Hungerhundes unter Zusatz derselben Substanzen durchströmt, so wurde das Blutaceton nach der Durchblutung in seiner Menge vermehrt vorgefunden. Diese experimentelle Tatsachen zeigten uns, dass für die Herabsetzung der Acetonbildungsfähigkeit bei Hunger nicht das verwendete Blut, sondern die Magenwand selbst verantwortlich ist, und gleichzeitig bestätigten sie, dass die Vermehrung des Acetonwertes nach Durchblutung des Gesundmagens in der I. Mitteilung in der Magenwand, nicht aber im durchströmten Blut gewonnen worden war.

LITERATUR.

- Baer, K. (1906–1908–1910): Arch. f. Experim. Pathl. u. Pharmacol., 56–59–62.
Emlden, G. (1908–1906): Hofmeister Beitrag.
Hammarsten: Lehrbuch der Physiologischen Chemie.
Ikebe, K. (1933): The Journ. of biochemistry, 17, 2.
Lichtwitz, L.: Handb. d. Inn. Med. Bergmann, G. u. Stäehelin, R. 4, 949.
Matsuo, I. (1934): The Journal of Gastroenterology 10, 7.
Matsuoka, Y. (1933): The Journ. of biochemistry, 17, 2.
Murakami, H. (1934): The Journal of Gastroenterology, 9, No. 4.
Muraoka, S. (1935): Nagasaki-Iggakaizashi, 13, No. 11.
Takahata und Kume: Fukuoka-Iggakai-Zasshi, 19, 154.
Tsuru, N. (1935): The Journ. of biochemistry, 21, No. 2.
Tsutsui, T. (1936): Nagasaki-Iggakaizashi, 14, No. 4.
Yoshida, Y. (1933): The Journ. of biochemistry, 17, 2.

ÜBER DIE PROTEOLYTISCHEN FERMENTE DER PANKREASDRÜSE DER KANINCHENS.

IV. Mitteilung: Über die proteolytischen Fermente der Pankreasdrüse, deren Ausführungsgänge unterbunden worden sind.

VON

FUYUTAROO ITZIOKA.

*(Aus dem Utzino-Laboratorium des Institutes für Chemie
an der Kaiserlichen Universität Kyoto.
Vorstand: Prof. S. Utzino.)*

(Eingegangen am 1. Februar 1937)

In meinen früheren Mitteilungen (1936) habe ich darüber berichtet, dass der Mazerationssaft des Kaninchenspankreas schon aktives Trypsin und Peptidase enthält, während der Pankreassekretsaft nur inaktives Trypsinogen aufweist, das erst durch Enterokinase aktiviert werden kann. Unter den Acyl- und Halogenacylaminosäuren war nur die Chloracetylaminosäure durch den Sekreisaft (unabhängig von der Aktivierung) angreifbar. Es ist eine allgemein bekannte Tatsache, dass durch Unterbindung der Ausführungsgänge der Pankreasdrüse die sezernierenden Zellen mit der Zeit geschädigt werden, während die Langerhansschen Inkretzellen noch in Funktion bleiben (1927). So taucht nun die Frage auf, wie sich die proteolytischen Fermente bei der Unterbindung der Ausführungsgänge des Pankreas verhalten. Weiter kommt auch stets die Proteolyse der Pankreasdrüse bei der Erklärung der akuten Pankreasnekrose in Betracht. Um einerseits etwas zur pathologischen Biochemie der Pankreasdrüse beizutragen und andererseits die genetische Beziehung der Pankreasproteasen zu erklären, habe ich unter Leitung von Prof. S. Utzino die Untersuchung der proteolytischen Wirkungen der Pankreasdrüse mit unterbundenen Ausführungsgängen unternommen. Auf Grund meiner Beobachtungen ist anzunehmen, dass der Mazerationssaft

des Pankreas nach der Unterbindung der Ausführungsgänge nicht mehr imstande ist, Casein oder Gelatine zu hydrolysieren, während der des gesunden Kaninchens, wie in der vorigen Mitteilung angegeben, diese Eiweisskörper leicht anzugreifen vermag. Nach Zusatz von Enterokinase wurde auch nur eine unbedeutend geringfügige Aciditätszunahme beobachtet. Hier ist noch zu erwähnen, dass auch Pepton und Cholracetyl-*L*-phenylalanin durch den Mazerationssaft nur in sehr schwachem Grad (erst nach 72 Std.) hydrolysiert werden, während die Substrate durch den Normalsaft leicht angreifbar sind.

Es ist nun mit grosser Wahrscheinlichkeit anzunehmen, dass die diesbezüglichen Wirkungen in Beziehung zu der Funktion der durch Unterbindung der Ausführungsgänge der Pankreasdrüse geschädigten Zellen, und zwar der sezernierenden, stehen.

Was die Peptidasewirkung anbetrifft, so bleibt diese aber noch in deutlichem Masse erhalten, was man daraus ersieht, dass Dipeptide und Tripeptide noch deutlich hydrolysiert werden. Auch diese Beobachtung spricht für meine Annahme, dass die Peptidasewirkung des Mazerationssaftes der gesunden Pankreasdrüse nichts mit dem Sekreassaft zu tun hat, sondern von den Gewebszellen herrührt.

Bei der Prüfung der aktivierenden Wirkung des Mazerationssaftes des behandelten Kaninchens betreffs des inaktiven Normalpankreassaftes des gesunden Kaninchens hat man eine deutliche Aciditätszunahme bei der Caseindigestion beobachtet, was wohl für die noch gebliebene aktivierende Wirkung des Mazerationssaftes spricht, dessen Trypsinwirkung aber durch die Unterbindung der Ausführungsgänge fast vollständig vernichtet worden war. Die Spaltung von Benzoyldiglycin wurde wie bei den gesunden Kaninchen (1936) auch hier nicht festgestellt. Hier sei noch erwähnt, dass der Mazerationssaft der Dünndarmschleimhaut des Kaninchens, dem die Ausführungsgänge des Pankreas unterbunden sind, noch fähig ist, Gelatine in starkem Masse anzugreifen. Diese Wirkung rührt vielleicht hauptsächlich von der Dünndarmschleimhaut her, obgleich die akzessorische Kommunikation der Pankreasdrüse mit dem Dünndarm nicht ganz sicher auszuschliessen ist.

EXPERIMENTELLER TEIL

Enzymlösung: Als Versuchstiere wurden Kaninchen verwendet, denen die Ausführungsgänge so viel wie möglich unterbunden worden waren und die nach einer bestimmten Zeit (3–10 Wochen) getötet wurden. Die Enzymlösung wurde in der Weise hergestellt, dass Pankreasbrei mit dem 6-fachen Volumen Glycerin-Wasser (6:4) gut zerrieben und durch ein feines Sieb koliert wurde. Der Mazerationssaft wurde unter Toluolzusatz im Eisschrank aufbewahrt.

Versuchsansatz: Als Hauptversuch wurden je 20 ccm 1% iger Eiweiss- oder Peptonlösung oder 0.05-Mol Peptidlösung mit je 3 ccm Mazerationssaft unter Toluolzusatz bei 37° digeriert. Die Aciditätszunahme in 4 ccm Digestionslösung wurde nach Sørensen mit 0.1 n-NaOH titriert. Zur Kontrolle wurde die Enzymlösung ohne Substrat digeriert. Nach Subtraktion dieser Kontrollwerte wurden die Werte der Aciditätszunahme in Tabellen zusammengefasst.

Versuch 1. Spaltung von Eiweissstoffen durch den Mazerationssaft der Pankreasdrüse, deren Ausführungsgänge unterbunden worden sind. (3 Wochen nach der Unterbindung).

Um die Frage zu beantworten, ob die Inaktivität des Mazerationssaftes auf das Ausbleiben der Kinasewirkung der Pankreasdrüse mit unterbundenen Ausführungsgängen zurückzuführen ist, wurden 20 ccm Mazerationssaft mit 0.05 oder 0.01 g Kinasepulver in der schon berichteten Weise behandelt (1936). Zwecks Digestion wurden je 20 ccm der Substratlösung mit 3 ccm dieses mit Kinase behandelten Saftes versetzt (B). Bei dem Versuchen (C) wurde 1 ccm frischer Pankreassaft (mit Wasser aufs 9-fache verdünnt) mit 1 ccm Mazerationssaft behandelt, um die aktivierende Wirkung des letzteren zu prüfen. 20 ccm Substratlösung enthalten 3 ccm dieser Lösung.

Tabelle I zeigt, dass durch den Mazerationssaft des Kaninchenpankreas mit unterbundenen Ausführungsgängen, weder Casein noch Gelatine hydrolysierbar ist. Die gleichen negativen Resultate wurden auch bei dem Versuche mit dem

TABELLE I.

Enzymlösung	Zeit (Std.)	Aciditätszunahme in 4 ccm (ccm 0.1 n-NaOH)	
		Casein (1%) PH 7.5	Gelatine (1%) PH 7.5
A Mazerationssaft: 3 ccm + 20 ccm Eiweisslösung	5	0.06 0.04	0
	8	0.05 0.06	0
	24	0.09 0.06	0.01
B Mäzerationssaft: (20 ccm mit a) 0.05 g oder b) 0.01 g Kinase be- handelt) 3 ccm + 20 ccm Eiweiss- lösung	5	a) 0 b) 0.13	a) 0.01
	24	0.13 0.18	0.05
	72	0.28 0.22	0.19
C Normaler Pankreassaft: (1 ccm + 8 ccm Wasser mit 1 ccm Mazerationssaft behandelt) 3 ccm + 20 ccm Eiweisslösung	5	0.12	—
	24	0.30	—
	72	0.66	—
D Normaler Pankreassaft: (1 ccm + 9 ccm Wasser mit a) 0.05 g oder b) 0.01 g Kinase behandelt) a) 4 ccm oder b) 3 ccm + 20 ccm Eiweiss- lösung	5	a) 0.70 b) 0.29	—
	24	0.80 0.69	—
	72	0.99 0.69	—

Kaninchenpankreas, dessen Ausführungsgänge 4 Wochen lang unterbunden waren, beobachtet.

Wenn man die Resultate mit denjenigen bei normalen (1936) vergleicht, sieht man, dass die Di- und Triptidasewirkung des Mazerationssaftes von Pankreas mit unterbundenen Ausführungsgängen fast nicht herabgesetzt sind, während Pepton und Chloracetylphenylalanin nur schwach angegriffen werden.

Versuch 2. Spaltung von Peptiden durch den Mazerationssaft der Pankreasdrüse mit unterbundenen Ausführungsgängen. (4 Wochen nach der Unterbindung).

TABELLE II.

Substrat (0.05 Mol-Lösung)	Zeit (Std.)	Aciditätszunahme in 4 ccm (ccm 0.1 n-NaOH)
Glycylglycin (PH 7.7)	4	0.20
	8	0.29
	24	0.47

<i>dl</i> -Leucylglycin (P _H 7.0)	4	0.15	
	8	0.31	
	24	0.72	
<i>dl</i> -Leucyldiglycin (P _H 7.5)	5	0.33	
	24	0.74	
	72	0.87	
Caseinopepton (1%) (P _H 7.5) (a) 10 Wochen und b) 3 Wochen nach der Unterbind.)	5	a) 0.03	b) 0.06
	24	0.15	0.11
	72	0.30	0.27
Mazerationssaft (3 cem mit 0.01 g Kinase behandelt) 4 cem + 20 cem Peptonlösung	5	0.08	
	24	0.20	
	72	0.35	
Chloracetyl-l-phenylalanin (P _H 7.5) (3 Wochen nach der Unterbind.)	5	0.006*	
	24	0.030	
	72	0.085	
Benzoyldiglycin (P _H 7.2)	5	0	
	24	0	
	72	0	

* NH₂-N Zunahme (mg) in 1 cem Digestionslösung.

*Versuch 3. Wirkung der Dünndarmschleimhaut¹⁾ und des
Pankreassaftes²⁾ von Kaninchen mit unterbundenen
Pankreasausführungsgängen.
(10 Wochen nach der Unterbindung)*

1) Bei dem Versuch wurde der Mazerationssaft der Dünndarmschleimhaut von Kaninchen verwendet, denen die Ausführungsgänge des Pankreas schon 10 Wochen lang unterbunden waren. Durch diesen Mazerationssaft wurde Gelatine ziemlich stark hydrolysiert.

2) Bei einem Kaninchen gewann ich zufällig eine klare, schwach gelbliche Saftansammlung in dem zystisch erweiterten Ausführungsgang, der 10 Wochen vorher unterbunden worden war.

Um die tryptische Wirkung des Saftes zu prüfen, wurde 1 cem desselben (mit Wasser aufs 10 fache verdünnt, mit 0.05 g Kinase-

TABELLE III.

Substrat	Zeit (Std.)	Aciditätszunahme in 4 ccm Digestionslösung (PH 7.5) (ccm 0.1 n-NaOH)	
		1) Dünndarmschleimhaut. (1 g + 6 ccm Glycerin- Wasser) 3 ccm	2) Pankreassaft 1 ccm + 9 ccm H ₂ O + 0.05 g Kinase) 4 ccm
Gelatine (1%) 20 ccm	5	0.15	
	24	0.85	—
	72	1.86	
Casein (1%)	5		0.02
	24	—	0
	72		0.16

pulver behandelt, und 4 ccm dieser so behandelten Saftlösung wurden als Enzymlösung für 20 ccm 1%iger Caseinlösung verwendet. Die Probe zeigte fast keine Wirkung auf Casein.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die proteolytische Wirkung betreffs der Pankreasdrüse, deren Ausführungsgänge unterbunden worden sind, untersucht.

1. Der Mazerationssaft der Pankreasdrüse mit unterbundenen Ausführungsgängen zeigt fast keine Trypsinwirkung mehr, vermag aber noch normalen Pankreassaft zu aktivieren.

2. Dipeptid und Tripeptid werden durch den Mazerationssaft stark angegriffen, während Chloracetylphenylalanin und Pepton durch ihn nur in geringerem Grade spaltbar sind.

3. Der Mazerationssaft der Dünndarmschleimhaut von Kaninchen mit unterbundenen Ausführungsgängen der Pankreasdrüse vermag die Gelatinelösung deutlich zu hydrolysierten.

LITERATUR.

Itzioka, F. (1936): J. of Biochem., **24**, 139.

„ („): ebenda, „, 267.

Macleod, J. J. R. (1927): Kohlenhydratestoffwechsel und Insulin (J. Springer, Berlin).

ÜBER DEN EINFLUSS DER GALLE AUF DIE PANKREAS- UND DIE DÜNNDARM- PROTEOLYSE.

VON

FUYUTAROO ITZIOKA.

*(Aus dem Utzino-Laboratorium des Institutes für Chemie
an der Kaiserlichen Universität Kyoto.
Vorstand: Prof. S. Utzino.)*

(Eingegangen am 1. Februar 1937)

Vom Standpunkt der Verdauungsphysiologie haben H. J. Vonk und sein Mitarbeiter (1929) als zwei Faktoren, welche es ermöglichen, dass die Verdauung eines Substrates, welche bei PH 8,0 günstig verläuft, noch bei neutraler oder schwach saurer Reaktion glatt vor sich gehen kann, erstens die Bewegung der Verdauungsmasse und zweitens die Aktivierung der Enzymwirkung (Trypsins) auf festes Eiweiss bei schwach saurer Reaktion durch Galle angegeben. Sie fanden nämlich, dass für Fibrin (ungelöstes Eiweiss) die Galle einen stark beschleunigenden (mehr als doppelt) Einfluss bei saurer Reaktion (PH 6,0), aber einen schwach hemmenden bei kleiner Konzentration ausüben kann. Diese Tatsache wurde auch bei Versuchen mit Natriumtaurocholat festgestellt. Für das Aktivierungsvermögen der Galle wird hiermit das Gallensäuresalz als massgebender Faktor in Betracht gezogen. Die Aktivierung durch Galle in höherer Konzentration (1/20 Teile der Lösung) bei saurer Reaktion (PH 6,0) wurde weiter für Hecht- und Rindfleisch bestätigt (1933). Betreffs der Peptonlösung als ein gelöstes Substrat ist aber kein beschleunigender Einfluss der Galle bei schwach saurer Reaktion aufgefunden worden. Nach der älteren Feststellung von W. E. Ringer (1921, 1922) sollte die Galle einen hemmenden Einfluss auf die Verdauung von festem Eiweiss bei alkalischer Reaktion ausüben. E. Waldschmidt-Leitz (1924) gab auch an, dass die Galle bei alkalischer Reaktion (PH 8,7) keinen Einfluss, aber bei saurer sogar einen hemmenden

auf die Gelatinedigestion durch Trypsin-Kinase hat. Nach der Vermutung von Vonk für die Erklärung dieser widersprechenden Angaben soll dies wahrscheinlich darin liegen, dass die Versuche nicht mit verschiedenen Konzentrationen der Galle angestellt wurden. Für die Peptonverdauung durch Pankreaktin haben Vonk und sein Mitarbeiter ein viel weiteres Optimum als für Fibrin gefunden. Was die pH -Werte bei Trypsinwirkung anbetrifft, möchte ich hier an meine vorigen Mitteilungen (1936) erinnern, wonach eine ziemliche starke Caseinhydrolyse durch Pankreassaft oder durch Pankreasmazerationssaft auch bei schwach saurer Reaktion beobachtet werden kann. Nach einer längerer Digestionsdauer (z. B. 24 Std.) scheint auch die Leucylglycinspaltung bei schwach saurer Reaktion in deutlichem Grade aufzutreten. Und so habe ich damals darauf aufmerksam gemacht, dass in Bezug auf die pH -Werte der Proteolyse immer die Konzentration und die Eigenschaften der Substrate und der Enzymlösung in Betracht gezogen werden müssen. Da ich anderseits keine aktivierende Wirkung der Galle gegenüber unaktivem Trypsinogen (Pankreassaft des Kaninchens) festgestellt habe (1937), würde es sehr interessant sein zu prüfen, wie die Digestion der Eiweisslösung durch Gallenzusatz beeinflusst werden kann. Unter Berücksichtigung der verschiedenen pH -Werte habe ich auf Veranlassung von Herrn Prof. S. Utzino Versuche mit Galle in verschiedenen Konzentrationen angestellt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Galle des Kaninchens fast keinen fördernden Einfluss auf die tryptische Wirkung der Pankreasdrüse oder der Dünndarmschleimhaut ausübt. Hier sei erwähnt, dass die Versuche ausschliesslich mit löslichem Eiweiss ausgeführt wurden, während E. J. Vonk dabei unlöslichen Proteinstoff verwendet hat. Die Resultate erinnern aber an die von Vonk mit Pepton erzielten Angaben.

Die Erepsinwirkung, die eine grosse Rolle bei der Darmverdauung spielen soll, wird durch Zusatz von Galle auch nicht beschleunigt. Eine höhere Konzentration der Galle übte dagegen einen hemmenden Einfluss auf die Enzymwirkung.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Versuch 1. Einfluss der Kaninchengalle auf die Caseinhydrolyse bei verschiedenen PH-Werten durch den Pankreas-mazerationssaft des Kaninchens.

1 Teil Pankreasbrei wurde mit dem 6 fachen Volumen Glycerin-Wasser (6:4) zerrieben und koliert. 20 ccm 1%iger Casein-Pufferlösung, welche Galle in verschiedenen Mengen enthält, wurden mit 3 ccm Enzymlösung versetzt und unter Toluolzusatz bei 37° digeriert. In der Tabelle ist die kontrollierte Aciditätszunahme in 4 ccm Digestionslösung angegeben. Die Gallenmenge zeigt den Volumteil derselben in 20 ccm Digestionslösung.

TABELLE I.

Zeit (Std.)	Gallenmenge	Aciditätszunahme in 4 ccm Digestionslösung (ccm 0,1 n-NaOH)				
		PH				
		6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
5	1/20	0,95(6,4)*	0,92(7,0)	0,96(7,5)	0,89(7,5)	0,69(7,8)
	1/30	0,96 („)	0,90 („)	0,98 („)	0,92 („)	0,70 („)
	1/50	1,00(6,3)	0,91 („)	0,94 („)	0,95 („)	0,75 („)
	1/75	0,98 („)	0,96 („)	0,95 („)	0,91 („)	0,77 („)
	1/100	0,99 („)	0,94 („)	0,94(7,4)	0,93 („)	0,75 („)
	0	0,95 („)	0,95 („)	0,96 („)	0,95 („)	0,73 („)
24	1/20	1,26	1,35	1,37	1,30	1,08
	1/30	1,35	1,29	1,37	1,33	1,11
	1/50	1,42	1,37	1,35	1,32	1,12
	1/75	1,41	1,39	1,36	1,33	1,12
	1/100	1,41	1,45	1,35	1,33	1,16
	0	1,46	1,43	1,39	1,33	1,15
72	1/20	1,33	1,43	1,49	1,41	1,22
	1/30	1,37	1,42	1,48	1,42	1,33
	1/50	1,43	1,42	1,48	1,42	1,36
	1/75	1,45	1,42	1,48	1,44	1,39
	1/100	1,44	1,52	1,46	1,41	1,36
	0	1,46	1,53	1,54	1,48	1,33

* Die Zahlen in Klammer geben die wieder geprüften PH-Werte an.

Versuch 2. Einfluss der Kaninchengalle auf die Gelatinedigestion bei verschiedenen PH-Werten durch den Mazerationssaft der Dünndarmschleimhaut des Kaninchens.

Hier wurde 1 Teil Schleimhautbrei mit dem 3 fachen Volumen Glycerin-Wasser wie im Versuch 1 zerrieben und koliert. 20 ccm 1%iger Substrat-Pufferlösung mit 2 ccm Enzymlösung versetzt und unter den gleichen Bedingungen wie im Versuch 1 digeriert.

TABELLE II.

Zeit (Std.)	Gallenmenge	Aciditätszunahme in 4 ccm Digestionslösung. (ccm 0,1 n-NaOH)				
		PH				
		6,0	6,5	7,0	8,0	9,0
3	1/10	0 (6,3)	0,10 (6,7)	0,10 (7,1)	0,13 (7,9)	0,12 (8,2)
	1/20	0,02 (6,0)	0,13 (6,5)	0,14 (7,0)	0,15 (7,6)	0,13 (8,0)
	1/50	0,04 („)	0,12 (6,2)	0,28 (6,9)	0,29 (7,4)	0,21 („)
	1/100	0,06 (6,1)	0,15 (6,3)	0,19 (7,0)	0,25 (7,5)	0,19 (7,8)
	0	0,07 (6,0)	0,12 („)	0,24 („)	0,27 (7,3)	0,15 (7,7)
8	1/10	0,01	0,44	0,41	0,47	0,45
	1/20	0,12	0,52	0,59	0,58	0,55
	1/50	0,23	0,49	0,90	0,91	0,85
	1/100	0,13	0,55	0,66	0,76	0,74
	0	0,24	0,60	0,80	0,91	0,90
24	1/10	0,66	1,84	1,65	1,74	1,69
	1/20	0,55	1,70	1,76	1,86	1,67
	1/50	0,97	1,52	2,50	2,62	2,29
	1/100	0,68	2,16	2,19	2,44	2,41
	0	0,87	2,07	2,30	2,51	2,40

Versuch 3. Einflüsse der Kaninchengalle auf die Diglycin-hydrolyse bei verschiedenen PH-Werten durch den Mazerationssaft der Dünndarmschleimhaut des Kaninchens.

20 ccm 1/20 Mol-Dipeptidlösung wurden der Digestion unter den gleichen Bedingungen wie im Versuch 2 unterworfen.

TABELLE III.

Zeit (Std.)	Gallenmenge	Aciditätszunahme in 4 ccm Digestionslösung (ccm 0,1 n-NaOH)				
		PH				
		6,0	6,5	7,0	8,0	9,0
3	1/10	0 (6,0)	0	0,10	0,29 (8,1)	0,20
	1/20	0 (6,1)	0,10	0,20	0,35 („)	0,17
	1/50	0	0,24	0,58	0,56 (8,2)	0,46 (9,1)
	1/100	0 („)	0,33	0,60	0,77 (8,3)	0,59 (9,2)
	0	0,11	—	1,00	1,19	0,55
8	1/10	0	0,05	0,29	0,59	0,37
	1/20	0	0,15	0,38	0,55	0,35
	1/50	0	0,34	0,70	1,00	0,59
	1/100	0,05	0,56	0,85	1,02	0,90
	0	0,30	—	1,56	1,39	0,72
24	1/10	0	0,20	0,74	1,04	0,77
	1/20	0	0,45	0,83	0,83	0,60
	1/50	0,12	0,71	1,17	1,28	0,89
	1/100	0,23	1,01	1,53	1,35	1,25
	0	0,67	—	1,63	1,46	1,09

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Kaninchengalle übt keinen fördernden Einfluss auf die Caseindigestion durch den Pankreasmazerationssaft des Kaninchens aus.

2. Die Kaninchengalle blieb auch ohne beschleunigende Wirkung auf die Gelatine- oder Diglycinspaltung durch die Dünndarmschleimhaut des Kaninchens, übt dagegen einen hemmenden Einfluss in höherer Konzentration aus.

LITERATUR.

- Itzioka, F. (1936): J. of Biochem., **24**, 139 und 267.
 „ (1937): ebenda, **26**.
 Ringer, W. E. (1921): Z. f. physiol. Chem., **116**, 107.
 „ (1922): ebenda, **124**, 171.
 Vonk, H. J. und Wolvekamp, H. P. (1929): ebenda, **182**, 175.
 Vonk, H. J. und Mitarbeiter (1933): ebenda, **218**, 33.
 Waldschmidt-Leitz, E. und Mitarbeiter (1924): ebenda, **132**, 181.

CHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL STUDIES ON MUSCLE PROTEINS OF SOME INVERTEBRATES.

By

I. LEONT'EV AND K. MARKOV.

(*Laboratory for the study of proteins, Moscow.*)

(Received for publication, February 7, 1937)

1.

The investigation of the proteins of muscular tissues is of theoretical interest in many respects. This is particularly true with regard to the proteins from the muscles of invertebrates. However, these proteins have been but little studied, although some of the species of these animals, especially marine ones, possess considerable economic importance (1923).

The present article is devoted to the description of a series of experiments, the purpose of which was to fill up partly the existing gap in the chemistry of the muscular tissue proteins of invertebrate animals.

2.

On purely technical grounds, the following three species were selected for this comparative chemical and immunological study of the muscular proteins of invertebrates:

1. *Cucumaria frondosa* Gunn.
2. *Pecten islandicus* Müll.
3. *Potamobius fluviatilis* L.

In the first of these—a representative of the class of Echinodermata—the longitudinal and transversal muscles were utilized for the experiments; in the second—a representative of the class of Mollusca—the obturative muscle; and finally, in the craw-fish—a representative of the Crustacea—the ventral muscles were used for the extraction of protein.

The entire process of isolating the protein substances from the muscular tissues of the animals mentioned, consisted of several simple operations, slightly modified in the case of the holothuria.

However, our method of preparing protein extracts from the muscular tissue was essentially different from the one usually applied in working with the muscular tissue of vertebrates (1923). We did not extract the proteins from fresh muscles with the aid of salt solutions, but from muscles fixed with alcohol, with a sodium hydroxide solution.

It was established by preliminary experiments that the sodium hydroxide solution represents the most suitable dispersing medium for the case in question (Table I).

TABLE I.

Powdered muscles of holothuria				
% of N before extraction	% of N after extraction (24 hours) at 18°C.			
	H ₂ O	N/10 NaOH	N/1 KI	N/117 NaCl
14,67	14,66	13,60	14,60	14,68

Thus, e.g., we cut out with a lancet the muscle of a *Pecten** immediately after it was caught, dissected and washed with fresh water. The muscle was cut into small pieces with scissors and then fixed in a large amount of ethyl alcohol (96°).

The holothuriae were also cut into pieces longitudinally, immediately after they were collected; at the same time, their internal organs were mechanically removed. The separated muscles were quickly cut into small pieces with scissors and fixed. In the laboratory the fixed bits of muscles of all the species investigated were chopped with a meat-grinder and again put into alcohol. The alcohol treatment of the muscles of holothuria was particularly long; the intense red pigment of these muscles made it necessary to change the alcohol daily during one month.

* The animals were collected by one of us (I. LEONT'EV) in August 1933, in the estuary of the Kola Bay of the Barents Sea.

After this alcohol treatment, the muscles were transferred to an ether bath (at 18°C), and after 125 hours of this treatment, were desiccated in an incubator (at 50-60°C). Then the dried muscles were powdered with the aid of a china ball-mill.

The craw-fish were treated exactly like the holothuriae. The ventral part was separated from the rest of the body and liberated from its chitin covers. Before cutting into pieces and fixing the muscles of the craw-fish, we removed the intestines. The further treatment of the craw-fishes' ventral muscles was similar to that applied to the muscles of the pectens and holothuriae.

The protein substances were extracted from the powders (obtained in the manner described above) by a *N*/20 NaOH solution for 48 hours (at 18°C), and precipitated with a 3 per cent solution of furfural-free acetic acid. The precipitate was washed with distilled water, redissolved in *N*/10 NaOH and again coagulated with 3 per cent acetic acid. This precipitation was repeated 5 times. The protein thus obtained was thoroughly washed on a filter with distilled water and the water was removed by subsequent alcohol treatment, consisting in consecutive transfers through baths with a rising concentration of alcohol (60, 90, 95, 100°). From the alcohol, the protein preparations were removed to an ether bath. They were freed from ether in a vacuum desiccator (with CaCl_2) at 30-40°C.

The appearance of our protein preparations was that of snow-white, or slightly yellowish, very fine and mellow powders, which did not dissolve in distilled water or in 10% sodium chloride, even when heated, but dissolved readily in a mixture of salts (KCl, NaCl, H_2PO_4 , 1 g of each in 1000 ml H_2O).

The analyses of the protein preparations thus obtained showed an almost complete coincidence of a number of their chemical indices (cf. Table II).

This coincidence of the chemical indices of the proteins from the muscles of the holothuriae, pecten and craw-fish, which is evident even at a cursory glance, permitted us to conjecture that the quantitative expression of the chemical indices of these proteins stands in a certain relation with the very history of these sub-

TABLE II.

No	Chemical indices	Protein from the muscles of			Method
		Potamobius	Cucumaria	Pecten	
1.	Water	3.13%	3.19%	3.20%	Electric incubator W. Heracus (105°C).
2.	Ash	0.43%	0.48%	0.50%	Electric oven with china crucible.
3.	Titration number	8.5	8.6	8.6	Direct titration of water suspensions of the proteins (phenolphthalein).
4.	Oxidation number	7.4	7.4	7.4	According to STÁNEK-NEMEC (3).
5.	Total nitrogen	15.95%	15.76%	15.65%	Micro-KJELDAHL (4).
6.	Tyrosine	5.30%	5.08%	4.67%	Colorimetrically, according to WEISS (5).
7.	Tryptophane	1.56%	1.71%	1.58%	Idem, according to VOISENET (6).
8.	Arginine	4.6 %	4.4 %	NO data	Idem, according to SAKAGUCHI (7).

stances, i.e., with the almost identical process of their isolation from the muscular tissues. This assumption found some ground also in the almost complete analogy in the behaviour of the physical indices of a 1% solution of these protein preparation* (cf. Table III), Nos. 1-7.

We were able to establish a complete analogy by studying the curves of "racemisation" (1936) of the proteins described in the present paper.

In connection with our idea concerning the dependence of the physico-chemical properties of proteins and their origin and bearing in mind that Muralt and Edsall (1930) had observed a special physical phenomenon (double refraction of flow) in globulin, obtained both from the muscles of the frog—a vertebrate animal—and from those of the marine snail (*Busicon*)—an invertebrate, it seemed of interest to determine also the chemical

* Sodium proteinates [the amount of NaOH was equivalent to that of protein (at 18°C)].

TABLE III.

No	Physical indices	Proteins from the muscles of			Method
		Potamobius	Cucumaria	Pecten	
1.	Density	1.0025	1.0030	1.0040	AENDT's micro-pycnometer (8).
2.	Conductivity	$58,40 \times 10^{-5}$	$61,80 \times 10^{-5}$	$66,75 \times 10^{-5}$	WHEATSTONE bridge, according to ARZHENIUS (9).
3.	Surface tension (dyne/cm)	63.6	61.7	66.6	TRAUBE's stalagmometer and TATE's formula (10).
4.	Viscosity (dyne/cm)	0.021	0.032	0.018	OSTWALD's viscosimeter (9).
5.	Refraction	0.3352	0.3350	0.3351	ABBÉ's refractometer (9).
6.	Specific rotation	-62.8	-61.3	NO data	ZEISS' polarimeter (9)
7.	p'I of isoelectric point	- 4.7	4.7	4.7	Maximum flocculation in buffer acetate.

and physical indices of the protein from the muscles of the frog and to compare the results with those established for proteins from the muscles of holothuria, marine comb and crawfish.

For this purpose a protein preparation was obtained from the muscles of the hind limbs of the frog *Rana temporaria* L. by the same method which was used for obtaining the proteins from the muscles of invertebrates (p. 2). This preparation also readily dissolved in the mixture of salts mentioned above (p. 3).

As we expected a priori, the physical and chemical indices of this preparation checked well with those of the proteins from the muscles of invertebrates (cf. Table IV).

A $N/10$ solution of NaOH also proved to be the most suitable dispersing medium for the protein from frog muscles, fixed in alcohol (Cf. Table V).

The dependence of the chemical resp. physical indices of the protein with its history, as established by the above experiments (Table I-V) is in good agreement with the experiments of Muralt and Edsall (1930), who obtained the same positive result (double

TABLE IV.

No	Chemical indices	Protein from frog muscles	Method	Physical indices	Protein from frog muscles	Method
1.	Water	5.66%	Cf. Table II	Density	1.0015	Cf. Table III
2.	Ash	0.4 %		Conductivity	—	
3.	Total nitrogen	15.80%		Surface tension (dyne/cm)	64.0	
4.	Tyrosine	4.27%		Viscosity (dyne/cm)	0.018	
5.	Tryptophane	2.15%		Refraction	1.3350	
6.	Arginine	—		Specific rotation	—61,0	
7.	Titration number	8.0		pH of isoelectric point	4.7	
8.	Oxidation number	7.5				

A N/10 solution of NaOH also proved to be the most suitable dispersing medium for the protein from frog muscles, fixed in alcohol (cf. Table V).

TABLE V.

Powdered frog muscle				
Per cent of N before extraction	Per cent of N after extraction (24 hours) at 18°C			
	H ₂ O	N/10 NaOH	N/1 KI	N/117 NaCl
15.28	15.68	14.74	15.28	15.66

refraction of flow) in globulins (isolated with the aid of one method) from the muscles of different vertebrates, and a negative effect in proteins with a different history (casein and egg albumen).

3.

However, to satisfy the demands of modern biochemistry, it was necessary to corroborate the described similarity of the proteins from the muscles of three species of invertebrates with a biological method, permitting, according to the opinion of many

biochemists, of an exceptionally fine differentiation of proteins, whatever their source. One of the modifications of this method is, as it is known, the anaphylactic shock (1929).

Osborne (1924) was of the opinion, that in this modification "we have...the best of the now accepted methods of establishing the chemical individuality of proteins". No less categorical is, in this regard, the opinion of Wells (1929).

Experiments on guinea pigs (*Cavia cobaya* L.) revealed that reinjections of muscular proteins dissolved in the salt mixture mentioned above, (p. 3) of all the three invertebrates tested, produce a negative result; i.e., neither anaphylactic shock nor anaphylactic phenomena is observed in the experimental animals (Cr. Table VI) after the reinjection.

It must be mentioned here, that the protein preparation obtained from the muscles of holothuriae, when brought to an air-dry condition, showed in the course of the determination of its physical indices, a higher index of viscosity [0.032 dyne/cm], and the ability to produce an anaphylactic shock. This circumstance induced us to precipitate this preparation three times more and to subject it to dialyzation. Nevertheless, even after this operation, the muscular protein of the holothuria kept its viscosity index, losing, however, its antigenic activity.

We do not present any interpretation of the cause of this phenomenon as yet, intending to make it the object of our further studies.

Our results in regard to the antigenic properties of the muscular proteins of invertebrates deserve to be compared with those of Wells and Johnson (1909, 1932), who noted a marked loss in the antigenic capacity of egg albumen and of serum proteins after alkali treatment (1909, 1932).

These experiments immediately gave rise to the question regarding the physical structure of the antigens used, which, according to Pick (1929) is very important; though most immunologists agree with Landsteiner (1933), that the chemical properties of the antigen suffice for explaining its specificity, the more so since immunologic chemistry knows of no case of specificity, which would

TABLE VI.

	Protein from the muscles of		
	Potamobius	Cucumaria	Pecten
Dose used for the first injection	2.5-5.0 mg (0.5 or 1.0 ml of a 0.5% solution, pH=7.0) Subcutaneously	2.5-5.0 mg (0.5 or 1.0 ml of a 0.5% solution; pH=7.0), subcutaneously	2.5-5.0 mg (0.5 or 1.0 ml of a 0.5% solution; pH=7.0), subcutaneously.
Preanaphylactic period	14 days	14 days	14 days
Weight, sex, temperature of guinea pigs at moment of reinjection	185-280 g; ♂ ♂ and ♀ ♀; $t=37^{\circ}-38^{\circ}\text{C}$.	225-280 g; ♂ ♂ and ♀ ♀; $t=37^{\circ}-38^{\circ}\text{C}$.	275-350 g; - ♂ ♂ and ♀ ♀; $t=37^{\circ}-38^{\circ}\text{C}$.
Dose used for re-injection	20-40 mg (1.0 or 2 ml of 2% solution; pH=7.0) intravenously (v. jugularis).	20-40 mg (1.0 or 2.0 ml of 2% solution; pH=7.0) intravenously /v. jugularis).	20-40 mg (1.0 or 2.0 ml of 2% solution; pH=7.0) intravenously (v. jugularis).
Result	No anaphylactic reaction	No anaphylactic shock	No anaphylactic shock

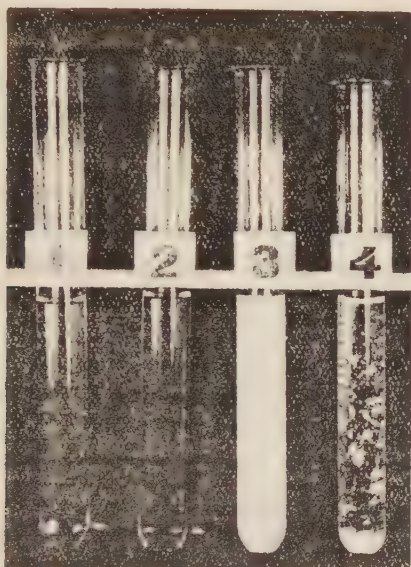
be determined purely physically (1922).

For elucidating the rôle of the dispersion of the solutions of muscular proteins from *Cucumaria frondosa*, *pecten islandicus* and *Potamobius fluviatilis* we utilized equivalent 500 solutions of these proteins, which already after 30-45 minutes produced precipitates (Figure No 1, test tube 43).

The technique of the preparation of such sols (Fig. 1, t.t. 3) is extremely simple and consists in merely mixing equal volumes of equivalent /250 solutions of sodium proteinates (Fig. 1, t.t. 1) and hydrochloric acid (Fig. 1. t.t. 2).

Moreover, our attention was attracted to solutions of this concentration and not to more stable salt solutions of the same proteinates, because some authors regard the anaphylactic shock as the result of mechanical circulatory disturbances.

Therefore, it seemed natural to expect that intravenous reinjection of such solutions would be more apt to reveal the antigenic properties of muscular proteins of the invertebrates tested.



Chemical and immunological studies on muscle proteins
of some invertebrates.

by I. Leont'ev and K. Markov.

Unfortunately, the result of these experiments, arranged in accordance with the generally accepted conditions (Cf. Table VI), was negative, i.e., the guinea pigs showed neither anaphylactic shock, nor any other symptom of anaphylaxis. Hence, one may affirm, that the physical condition of the solutions of the proteins tested does not affect the immunological properties of the proteins themselves.

This assumption might, probably, be extended to proteins with a different history.

4.

The totality of facts, described in the present paper, may be summed up in the following four theses:

1. It is possible to isolate from the muscles of the craw-fish (*Potamobius fluviatilis* L.), of holothuria (*Cucumaria frondosa* Gunn.) and of marine comb (*Pecten islandicus*

L.) with the aid of certain NaOH solutions proteins, possessing almost identical chemical and physical indices.

2. It is impossible to differentiate or to identify these proteins biologically (by means of anaphylaxis), because they proved to be non-shock proteins.

3. The analysis of the process of isolation of protein substances from the muscles of invertebrates and of the chemical indices of the proteins thus obtained shows that a definite relationship exists between the indices of the proteins and the process of their isolation.

4. The dependence of the chemical indices of proteins on the process of isolation of these substances is confirmed by experiments with frog muscle protein.

REFERENCES.

- Arndt, H. (1921): Berl. klin. Wochenschr., 204.
 Doer und Berger (1922): Klin. Wschr., 1, 449.
 Hawk, P. (1923): Pract. physiol. Chemistry, 374.
 Hawk, P.: loc. cit. 517.
 Johnson, L. and Worwall, A. (1932): Bioch. Journal, 26, 1202.
 Kopaczewski, W. (1923): Théorie et pratique des colloïdes, Paris, 110.
 Landsteiner, K. (1933): Die Specificität d. Serol. Reaktionen, Berlin.
 Leontiev, J. (1936): Arch. de physique biol.
 Michaelis, L. und Rona, P. (1930): Prakt. d. physik. Chemie, Berlin.
 Muralt, A. und Edsall, J. (1930): J. Biol. Chem., 89, 378.
 Osborne, Th. (1924): The vegetable proteins, New York.
 Ostwald-Luther (1931): Handbuch und Hilfsbuch zur Ausführung phys.-chem. Messungen, Leipzig, 5. Aufl.
 Pesci, E. (1922): Forme anaflattiche, Milano, 2 ed.
 Pfeiffer, H. (1929): Hdb. d. biol. Arbeitsmeth., hrg. v. Alderhalden 14, 2.
 Pick, E. (1929): Hdb. d. pathol. Mikroorg., 3. Aufl. 2, 317.
 Sakaguchi, K. (1925): J. of bioch., 6, 25.
 Stánek, V. und Nemec, T. (1932): Chem. Ztg., 59, 285.
 Tressler, D. (1923): Marine products of commerce, New York.
 Voisenet, E. (1905): Bull. Soc. chim., 33, 1198.
 Weiss, M. (1919): Bioch. Ztschr., 97, 170.
 Wells, H. (1929): The chemical aspects of immunochemistry, New York.
 Wells, H. (1909): J. of inf. dis., 6, 506.

ÜBER DIE BEDEUTUNG DER SCHILDDRÜSE BEI URIKOLYSE.

VON

CHUZO MORI.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik von Prof.
Dr. N. Kageura, Nagasaki.)

(Eingegangen am 10. Februar 1937)

EINLEITUNG.

Im Jahre 1860 wurde die Harnsäurespaltungsfähigkeit im Tierorganismus von Stockvis festgestellt, und danach haben Pfeifer (1860), Askolie (1903), Burian (1905), Brunton-Bockenham (1905), Schittenhelm (1905), Wiechowski u. Wiener (1907) u.s.w. nacheinander ihre Arbeiten über den Purinstoffwechsel veröffentlicht. Besonders haben die letzten zwei entscheidend festgestellt, dass im Tierorganismus Harnsäure zu Allantoin umgewandelt werden kann. Auch bei unszulande erschienen Mitteilungen von Ujihira (1932), von Oikawa (1933) u.s.w., und heute ist allgemein angenommen, dass das Organ mit der stärksten Fähigkeit, Harnsäure zu spalten, die Leber ist. Seit Magnus-Levy die Zunahme des Gesamt-N im Harn beim mit Schilddrüse überfütterten Tier festgestellt hat, sind viele Mitteilungen über dieses Problem erschienen und ist experimentell und klinisch nachgewiesen worden, dass bei Hyperthyreoidismus bzw. Schilddrüsenpräparatdarreichung der Gesamt-N im Harn zunimmt, d. h. dass Hyperthyreoidismus, der den Stoffwechsel im allgemeinen steigern soll, auch den Eiweissstoffwechsel lebhafter macht. Andererseits sind die auf den Einfluss von Thyroxin auf den Purinstoffwechsel bezüglichen Literaturangaben sehr spärlich und vielfach widersprechend, wie folgt: nach Krause und Crammer (1912) erleidet die Harnsäureausscheidung bei Menschen und Hunden durch Schilddrüsenpräparatdarreichung keinerlei Änderung. Dagegen hat Richter (1896) bei längerer Zufuhr von

Schilddrüse eine deutliche Vermehrung der Purinbasenausscheidung im Urin gefunden. Buadze (1933) hat Zunahme von Kreatinin, leichtgradige Zunahme von Allantoin nebst Gesamt-N im Harn durch Thyroxinbehandlung nachgewiesen.

Miyabara (1930) hat den endogenen Purinstoffwechsel bei Thyroxininjektion untersucht und gezeigt, dass Allantoin, das wichtigste Purinstoffwechselendprodukt, in grosser Menge im Harn ausgeschieden wird. Über Durchblutungsversuche bezüglich dieses Problems kann ich in der Literatur nichts finden. Andererseits wird nach Kageura (1922) der Kohlenhydratstoffwechsel bei Eiweissfettdiät gestört, und nach Ikeziri (1933) auch bei Hunger. Vor kurzem hat Tsutui (1936) festgestellt, dass Uricolyse durch Eiweissfettdiät verstärkt und durch Hunger herabgesetzt wird. Ich habe schon in einer vorhergehenden Arbeit gezeigt, dass die Zuckerassimilationskraft durch Zufuhr einer grossen Dosis Thyroxin deutlich geschädigt wird. Wie verhält sich nun die Harnsäureoxydation dabei, diese Frage scheint mir sehr interessant. Unter solchen Umständen unternahm ich die vorliegenden Untersuchungen.

VERSUCHSMETHODE.

Als Versuchstiere wurden nur ausgewachsene männliche Kaninchen von ca. 2 kg, die eine Woche lang mit Unohana gut genährt worden waren, gebraucht, weil neben der Art des Tieres und dem Entwicklungsstadium auch die Ernährungsweise für die Inkretwirkung von ausschlaggebender Bedeutung ist (Abderhalden und Wertheimer).

Als Kontrolle, einerseits mit dem aus fünf der oben erwähnten Kaninchen gesammelten und mit Lockescher Lösung zweifach verdünnten Blut (360 ccm) wurde eine Kaninchenleber, die bald nach der Verblutung entnommen worden war, eine Stunde lang durchströmt. Andererseits ohne Einschaltung der Leber wurde nur der Durchblutungsapparat durchströmt. Ausserdem wurden auch die genannten zweierlei Durchblutungen je mit Blut mit Zusatz von Harnsäure ausgeführt. Die Harnsäure wurde dabei in 0.4% Lithiumcarbonatlösung gelöst und gerade vor der Durchblu-

tung ins Blut eingegossen. Vor und nach der Durchblutung wurde der Gehalt des Blutes an Ammoniak, Harnsäure, Harnstoff und Allantoin bestimmt. Die Bestimmung von Ammoniak und Harnstoff erfolgte nach der Van Slyke-Cullenschen Methode, die der Harnsäure nach der kolorimetrischen Methode von Folin-Wu und das Allantoin wurde nach Wiechowski bestimmt, d. h. in dem in erster Linie der N-gehalt in der Allantoinfraktion gemessen und dann daraus die Allantoinmenge berechnet wurde. Der verwendete Durchblutungsapparat war der von Yamakawa-Mizuki. Hauptversuch. Als Thyroxin wurde Thyroxinlösung "Roche" benützt und Phosphor wurde in Form von 0,5% Olivö-lösung verwandt. Eine Gruppe Tiere wurde fünf Tage lang täglich mit pro kg 0,1 mg Thyroxin subcutan injiziert. Der zweiten Gruppe Tiere wurde täglich pro kg 0,2 mg Thyroxin gleichlang eingespritzt. Der dritten Gruppe Tiere wurde neben pro kg 0,2 mg Thyroxin auch pro kg 0,1 ccm von der vorher hergestellten Phosphorlösung subcutan injiziert. An diesen sämtlichen 3 Gruppen wurden Durchströmungsversuche durchgeführt, mit Hinzufügung von Harnsäure ins Blut. Das übrige Verfahren war ganz gleich dem der Kontrolle.

VERSUCHSERGEBNISSE.

1. Kontrolle.

a. Ohne Einschaltung der Leber und ohne Hinzufügung von Harnsäure ins Blut. Wie Tab. I zeigt, wies nur Ammoniak eine Tendenz zur leichten Vermehrung auf.

b. Ohne Einschaltung der Leber, aber mit Hinzufügung von Harnsäure ins Blut. Wie Tab. II zeigt, ist auch hier eine Tendenz zur leichten Zunahme von Ammoniak zu sehen.

c. Durchblutungsversuch der Leber ohne Hinzufügung von Harnsäure ins Blut. Wie Tab. III zeigt, nahmen die Mittelwerte der drei Fälle an Ammoniak, Harnstoff und Allantoin ein wenig zu (Je von 1,5 mg% auf 1,8 mg%, von 55,1 mg%, 57,8 mg%, von 2,2 mg% auf 4,1 mg%), während Harnsäure nach der Durchblutung kaum nachweisbar war.

d. Durchblutungsversuch der Leber mit Hinzufügung von

TABELLE I.

Nr. d. Kaninchens	Geschlecht.	Körpergewicht (kg)	Lebergewicht (g)	Durchströmungs- dauer (St.)	vor d. Durchströmung				nach d. Durchströmung			
					Ammoniak (mg%)	Harnstoff (mg%)	Harnsäure (mg%)	Allantoin (mg%)	Ammoniak (mg%)	Harnstoff (mg%)	Harnsäure (mg%)	Allantoin (mg%)
1	♂	2,00	70	1	1,2	48,3	Spur	2,3	2,1	50,2	Spur	2,7
2	♂	2,30	50	1	2,1	59,1	Spur	2,3	3,8	57,0	Spur	2,5
im Mittel					1,6	53,7	Spur	2,5	2,9	53,6	Spur	2,6

TABELLE II.

Nr. d. Kaninchens	Geschlecht.	Körpergewicht (kg)	Lebergewicht (g)	Durchströmungs- dauer (St.)	vor d. Durchströmung				nach d. Durchströmung			
					Ammoniak (mg%)	Harnstoff (mg%)	Harnsäure (mg%)	Allantoin (mg%)	Ammoniak (mg%)	Harnstoff (mg%)	Harnsäure (mg%)	Allantoin (mg%)
3	♂	2,20	65	1	1,8	52,0	30,0	6,3	2,5	50,5	29,3	6,8
4	♂	2,30	53	1	2,5	63,0	35,0	7,9	4,1	60,2	34,5	8,0
im Mittel					2,1	57,4	32,5	7,1	3,3	55,3	31,9	7,4

TABELLE III.

Nr. d. Kaninchens	Geschlecht.	Körpergewicht (kg)	Lebergewicht (g)	Durchströmungs- dauer (St.)	vor d. Durchströmung				nach d. Durchströmung			
					Ammoniak (mg%)	Harnstoff (mg%)	Harnsäure (mg%)	Allantoin (mg%)	Ammoniak (mg%)	Harnstoff (mg%)	Harnsäure (mg%)	Allantoin (mg%)
5	♂	2,00	54	1	2,7	49,9	Spur	2,3	2,0	79,7	0	5,4
6	♂	2,20	60	1	0,6	51,1	Spur	2,7	0,6	47,6	0	4,7
7		2,10	45	1	1,3	64,2	Spur	1,6	3,0	46,3	0	2,4
im Mittel					1,5	55,1	Spur	2,2	1,8	57,8	0	4,1

Harnsäure ins Blut. Wie die Mittelwerte in Tab. IV zeigen, blieb Ammoniak fast unverändert (vor der Durchblutung 1,7 mg%, nach der Durchblutung 1,6 mg%), Harnstoff nahm mässig zu (von 49,4 mg% auf 61,7 mg%), Harnsäure nahm deutlich ab (von 31,0 mg% auf 13,0 mg%) und Allantoin war auffallend vermehrt (von 4,3 mg% auf 18,7 mg%). Das Auffallende ist also die Harnsäurespaltung und Allantoinbildung.

TABELLE IV.

Nr. d. Kaninchens	Geschlecht	Körpergewicht (kg)	Lebergewicht (g)	Durchströmungs- dauer (St.)	vor d. Durchströmung				nach d. Durchströmung			
					Ammoniak (mg%)	Harnstoff (mg%)	Harnsäure (mg%)	Allantoin (mg%)	Ammoniak (mg%)	Harnstoff (mg%)	Harnsäure (mg%)	Allantoin (mg%)
8	♂	2,30	60	1	0,6	52,3	27,1	7,1	0,6	52,0	26,5	11,0
9	♂	2,10	65	1	2,5	48,5	28,1	4,2	1,8	95,5	12,7	18,4
10	♂	2,00	45	1	2,0	47,6	37,8	1,8	2,5	67,8	Spur	26,8
im Mittel					1,7	49,4	31,0	4,3	1,6	61,7	13,0	18,7

2. Hauptversuch:

a. Durchblutungsversuch der Leber des mit pro kg 0,1 mg Thyroxin subcutan injizierten Kaninchens (Tab. V).

Nach den Mittelwerten der 3 Fälle kann man sagen dass Ammoniak und Harnstoff leichte Zunahme zeigten (je von 1,3 mg% auf 2,2 mg%, und von 52 mg% auf 60 mg%), Harnsäure auffallend abnahm (von 35,5 mg% auf 8,2 mg%), Allantoin gegenüber Harnsäure sich deutlich vermehrte (von 1,8 mg% auf 21 mg%). Im Vergleich mit Tab. IV sind hier die Zunahme des Allantoins und die Abnahme der Harnsäure auffallender. Diese Tatsache bedeutet, dass bei Hyperthyreose Harnsäureoxydation und Allantoinbildung aufgesteigert sind.

b. Durchblutungsversuch der Leber des mit pro kg 0,2 mg Thyroxin subkutan injizierten Kaninchens.

Wie in Tab. VI zusammengestellt, nahmen einerseits Ammoniak ein

TABELLE V.

Nr. d. Kaninchens	Geschlecht.	Körpergewicht (kg)	Lebergewicht (g)	Durchströmungs- dauer (St.)	vor d. Durchströmung				nach d. Durchströmung				Bemerkungen
					Ammoniak (mg%)	Harnstoff (mg%)	Harnsäure (mg%)	Allantoin (mg%)	Ammoniak (mg%)	Harnstoff (mg%)	Harnsäure (mg%)	Allantoin (mg%)	
11	♂	2,00	45	1	1,3	49,9	35,2	2,3	1,3	66,4	0	23,7	pro kilo 100 mg Thyroxin tägl. 5 Tage lang injiziert
12	♂	1,80	50	1	0,6	46,4	34,7	1,6	1,5	45,0	24,6	13,4	
13	♂	1,85	55	1	2,0	60,1	36,8	1,5	2,0	69,0	0	26,1	
im Mittel					1,3	52,1	35,5	1,8	2,2	60,1	8,2	21,0	

wenig und Harnstoff mässig zu (je von 1,4 mg% auf 2,8 mg%, und von 54,6 mg% auf 64,1 mg%), andererseits verminderte sich die Harnsäure auffallend (von 33,5 mg% auf 8,5 mg%), dagegen vermehrte sich das Allantoin deutlich (von 5,1 mg% auf 24,9 mg%). Es ergibt sich aus dem oben Gesagten, dass der Purinstoffwechsel auch durch grosse Dosen Thyroxin stark gesteigert wird.

c. Durchblutungsversuch der Leber des mit pro kg 0,2 mg Thyroxin und zugleich pro kg 0,1 ccm 0,5% Phosphorlösung subkutan injizierten Kaninchens. Vergleich man die Mittelwerte in Tab. VII, so findet man, dass Ammoniak fast unverändert blieb (vorher 1,3 mg%, nahhher 1,0 mg%), Harnstoff dagegen ein wenig zunahm (von 55,1 mg% auf 59,7 mg%), Harnsäure fast unverändert blieb (vor der Durchblutung 35,1 mg%, nach der Durchblutung 34,7 mg%), und die Zunahme von Allantoin keineswegs sehr beträchtlich war (von 2,6 mg% auf 7,2 mg%). Das heisst, dass die Fähigkeit der Leber, Harnsäure zu Allantoin umzuwandeln, durch Phosphorinjektion gestört wird.

ZUSSAMMENFASSUNG MIT BESPRECHUNG.

Fasst man die Versuchsergebnisse zusammen, so kann man zuerst sagen, dass bei Hyperthyreose (Tab. V und VI) die die Harnsäure zu Allantoin oxydierende Kraft der Leber bemerkenswert stärker ist, als beim normalen Zustande (Tab. IV).

TABELLE VI.

Nr. d. Kaninchens	Geschlecht.	Körpergewicht (kg)	Lebergewicht (g)	Durchströmungs- dauer (St.)	vor d. Durchströmung				nach d. Durchströmung				Bemerkungen
					Ammoniak (mg%)	Harnstoff (mg%)	Harnsäure (mg%)	Allantoin (mg%)	Ammoniak (mg%)	Harnstoff (mg%)	Harnsäure (mg%)	Allantoin (mg%)	
14	♂	1,70	55	1	1,4	53,2	37,5	3,5	3,2	65,5	10,3	18,0	pro kilo 100 mg Thyroxin tägl. 5 Tagelang injiziert
15	♂	1,85	43	1	2,1	49,5	30,1	7,6	3,0	54,3	0	35,5	
16	♂	1,90	42	1	0,8	61,3	33,0	4,3	2,2	72,5	15,2	21,4	
im Mittel					1,4	54,6	33,5	5,1	2,8	64,1	8,5	24,9	

Dass die Leberzelle der Sitz des intermediären Purinstoffwechsels, also die Produktionsstätte der Fermente des Purinstoffwechsels ist, haben viele Untersuchungen gezeigt, besonders die von Schittenhelm. Chrometzka hat nachgewiesen, dass die überlebende Leber von Hund, Schwein und Kaninchen (Durchströmungsversuche) zur Abspaltung von Nucleosiden, zur Desamidierung und Oxidation von Purinbasen und Harnsäure einwandfrei befähigt ist. Mit allen diesen Untersuchungsergebnissen ist die zentrale Stellung der Leber im Purinhaushalt sicher bewiesen. Weiter fortschreitend, durch meine vorliegende Untersuchung ist es klar geworden, dass die Uricooxydasewirkung in der Leber, wodurch die Harnsäure bis zu Allantoin umgewandelt wird, bei experimenteller Hyperthyreose sehr viel lebhafter ist. Diese letzte Tatsache entspricht dem Umstand, dass bei Hyperthyreoidismus der Stoffwechsel im allgemeinen gesteigert ist.

Nach Wiechowski oxydieren überlebenden Säugetierorgane, die Harnsäure zu zerströren vermögen, die Harnsäure vollständig zu Allantoin, ohne diese weiter zu zersetzen. Nach meiner Untersuchung aber, bei Leberdurchblutung der mit Phosphor nicht vorbehandelten Kaninchen, vermehrte sich, wenn auch nicht viel, der Harnstoff in der Mehrzahl der Fälle (Tab. IV, V, VI.) hingegen bei Leberdurchblutung der phosphorvergifteten Kaninchen wurden Abnahme der Harnsäure und Zunahme des Allantoins fast nicht

nachgewiesen, zugleich blieb auch der Harnstoff fast unverändert (Tab. VII). Selbstverständlich ist es nicht möglich, aus dieser Tatsache allein ohne weiteres den Schluss zu ziehen, dass Allantoin zum Teil in der Leber weiter den Harnstoff zersetzt; trotzdem ist die Tatsache an sich sehr interessant. Über die Schädigung der Leber durch Phosphor gibt es seit alters viele Untersuchungen. Die mit der Zeit fortschreitende Abnahme des Glykogens, die

TABELLE VII.

Nr. d. Kaninchens	Geschlecht.	Körpergewicht- (kg)	Lebergewicht (g)	Durchströmungs- dauer (St.)	vor d. Durchströmung				nach d. Durchströmung				Bemerkungen
					Ammoniak (mg%)	Harnstoff (mg%)	Harnsäure (mg%)	Allantoin (mg%)	Ammoniak (mg%)	Harnstoff (mg%)	Harnsäure (mg%)	Allantoin (mg%)	
17	♂	2,30	60	1	0,6	61,8	37,0	2,3	0,6	72,5	36,7	11,8	2 Tage
18	♂	2,00	55	1	2,0	46,6	37,5	2,4	1,3	45,0	36,0	4,7	3 „
19	♂	2,10	57	1	1,3	57,1	32,0	3,2	1,3	61,8	31,4	5,3	4 „
im Mittel					1,3	55,1	35,1	2,6	1,0	59,7	34,7	7,2	Thyr. u Phosphor Injektions dauer

Fettablagerung, die Kleinzelleninfiltration, verschiedenartige Degeneration, Nekrose u. s. w. sind von vielen Forschern nachgewiesen worden. Inoue hat die Leber der mit Phosphor behandelten Tiere histologisch untersucht und gefunden, dass Fettablagerung sowohl in den Leberzellen als auch in den Sternzellen vorkommt, und zwar binnen kurzem nach der Phosphordarreichung. Kurzum, es ist heute ganz zweifellos, dass die Leber durch Phosphor histologisch nachweisbar geschädigt wird, und diese Tatsache allein genügt, um mein Untersuchungsergebnis zu erklären, dass bei Durchblutung der Leber des mit Phosphor injizierten Kaninchens, obwohl es gleichzeitig mit Thyroxin hyperthyreoisiert wurde, fast keine Harnsäure zu Allantoin umgewandelt wird. Auch Chrometzka hat bereits mitgeteilt, dass der Hund durch Tuscheinjektion allmählich die Harnsäureoxydationsfähigkeit ver-

liert und in seinem Urin die Allantoin-Harnsäurerektion immer mehr abnimmt. Er hat diese Funktionsstörung als eine Folge der dabei nachgewiesenen deutlichen Leberschädigung durch die Tusche angesehen (Leberfetteirrhose), und die zentrale Stellung der Leber im Purinstoffwechsel betont. Bei solcher Sachlage ist es leicht verständlich, dass die von Richter sowie Buadze beobachtete Erscheinung im Purinstoffwechsel wesentlich auf die durch Hyperthyreoidismus verursachte Steigerung der Leberfunktion zurückgeführt wird.

SCHLÜSSE

1. In der Leber des Kaninchens wird einerseits Harnsäure abgebaut und andererseits Allantoin gebildet.

2. Bei Leberdurchblutung mit dem mit Harnsäure vermengten Blut wird eine leichtgradige Zunahme des Harnstoffs nachgewiesen. Es ist nicht klar, ob diese Zunahme auf weitere Spaltung des Allantoins zurückzuführen ist.

3. Durch subcutane Injektion von Thyroxin steigert sich der Harnsäure oxydierende und Allantoin bildende Vorgang in der Leber.

4. Durch Darreichung von Phosphor wird die Fähigkeit der Leber, Harnsäure zu oxydieren und Allantoin zu bilden deutlich gehemmt.

Zum Schluss spreche ich Herrn Prof. Dr. N. Kageura meinen herzlichen Dank für seine freundliche Leitung aus, und gleichzeitig Herrn Dr. Y. Sendju für seine fördernde Beratung.

LITERATUR.

Alderhalden, London u. Schittenhelm (1909): Z. Physiol. Chem., **61**, 431.

Bollmann, Man u. Magath: Amer. J. Physiol., **72**, 629.

Boothy, W. M., L. Sandiford, K. Sandiford u. J. Slosse (1925): Erg. Physiol., **24**, 728.

Brunton u. Bockenham (1905): Zentralblatt f. Physiolog., **19**.

Burian (1909): Pflügers Archiv., **80**, 241.

Chrometzka, Fr., und E. Schnoor (1931): Z. exp. Med., **80**, 278–287.

Ders. (1933): Z. exp. Med., **86**, 483.

Chrometzka u. Gottlebe (1935): Klin. Wschr., **1**, 457.

- Chrometzka, Finke u. Uffenorde (1936): *Z. exp. Med.*, **97**, 653.
Chrometzka (1936): *Klin. Wschr.*, **51**.
Inbue (1935): *Nagasaki Igakkai Zassi*, **13**, 1.
Ikeziri (1933): *Nippon Shokakibyo-Zassi*, **32**, 11.
Juschtschenko (1912): *C. r. Soc. Biol. Paris*, **74**, 145.
Kopenhöfer (1936): *Virchows Arch.*, **297**, 271.
Krause, R. A. u. W. Crammer (1912): *J. Physiol.*, **44**, 22.
Langfeldt, Einar, u. Hørgen Holmsen (1925): *Biochem. Journ.*,
19, 4, 724–726.
Miyahara: *Sei-Zassi*, **53**, 8, 42.
Kageura, N. (1922): *Jour. of Biochem.*, **1**, 333 u. 389.
Ders. (1924): *ebenda*, **3**, 205 u. 457.
Oikawa (1933): *Sei-Zassi*, **52**, 12; **53**, 19.
Pfeifer (1906): *Beitr. Chem. Physiolog.*, **7**, 463.
Richter, P. F. (1896): *Zbl. inn. Med.*, **65**.
Schittenhelm (1827): *Zeitschr. f. Physiolog.*, **126**, 203.
Ders. (1905): *Z. f. Physiolog.*, **45**, 161.
Schittenhelm, A., und Fr. Chrometzka (1927): *Hope-Seylers*
Zeitschr. f. Physiol. Chem., **162**.
Ders. (1927): *Z. Physiol. Chem.*, **162**, 188.
Serverian Buadze (1933): *Z. exp. Med.*, **90**, 762–804.
Stockvis (1860): *Donders Archiv. Utrecht.*, **2**, 268.
Tsutsui (1936): *Nagasaki-Igakkai-Zassi*, **14**.
Uzihira: *Nippon Shokakibyo-Zassi*, **30**, 7, 11; 371.
Wiechowski u. Wiener (1907): *Beitr. Chem. Physiolog.*, **9**, 246.
Wilhelm Wiechowski (1907): *Beitr. Chem. Physiol. u. Pathol.*, **9**, 295.
Ders. (1907): *Beitr. Chem. Physiol. u. Pathol.*, **295**, 295.
Ders. (1908): *ebenda*, **11**, 109.
Ders. (1910): *ebenda*, **25**, 431.

ÜBER DIE BEDEUTUNG DER SCHILDDRÜSE IM ZUCKER- UND FETTSTOFFWECHSEL.

VON

DR. CHUZO MORI.

*(Aus der medizinischen Universitätsklinik von Prof.
Dr. N. Kageura, Nagasaki.)*

(Eingegangen am 10. Februar 1937)

EINLEITUNG.

Betreffs des Einflusses der Schilddrüse auf den Zucker- und Fettstoffwechsel gibt es bis heute schon viele Forschungsergebnisse. Sieht man die Literatur durch, so findet man jedoch, dass die Ergebnisse der einzelnen Autoren nicht immer übereinstimmen.

Zuerst betreffs des Einflusses der Schilddrüsenexstirpation auf den Blutzucker zeigten Jeanney und Isaacson (1917), Mark (1926), Boe (1914), Okada (1921), Takafuji (1921), Riu (1914) u.s.w. dass sie entweder keine Veränderung oder nur geringe Abnahme hervorruft. Das Leberglykogen bei thyreoidektomierten Tieren, nach Kuriyama (1917) erweist sich als abgenommen. Siegel (1929), Riu (1922), und Murao (1931) dagegen teilten die Zunahme desselben mit. Britton und Myers (1928) konnten keine Veränderung feststellen. Nach Hayasi (1921) wird das Leberfett entweder gar nicht beeinflusst oder nimmt nur leichtgradig zu. Sakurai (1930) und Nakazawa (1930) gaben an, dass es immer zunimmt.

Die Ergebnisse der Versuche an hyperthyreotischen Tieren sind auch nicht übereinstimmend. Bei Darreichung von Schilddrüsenpräparaten konnten Kuriyama (1917), Boe (1914), Uemura (1918), Oka (1925), Riu (1922) u.s.w. keinen oder nur geringen Einfluss derselben auf den Blutzucker feststellen, aber Mark (1926) wies immer Steigerung des Zuckergehaltes im Blut nach. Stockheim (1931) wies dabei Aufsteigen des Blutzuckergehaltes und Abnahme der Leberglykogenwerte nach, Kraus

(1921), Cramer(1924), Tuzi(1921), Riu(1922), Abderhalden u. Wertheimer(1929), Handel(1929), Omura(1922), Hayasi (1921) anderseits teilten Abnahme oder Schwinden der Leberglykogens mit. Nach Abelin und Kürsteiner(1928) tritt Abnahme des Leberfettes und Leberglykogengehalts ein, und auch Leites (1930) und seine Mitarbeiter konnten durch Thyroxinbehandlung eine Abnahme des Leberfettes und des Leberglykogengehaltes hervorbringen. Osima (1929) konnte eine geringe Zunahme des Leberfettgehalts nachweisen.

Durch die bisherigen Forschungen, die oben kurz erwähnt wurden, ist es fraglos, dass es irgendeine Beziehung der Schilddrüse auf den Zucker- und Fettstoffwechsel gibt, aber wie obenerwähnt sind die Forschungsergebnisse der einzelnen Autoren noch nicht einheitlich.

Gerade diese Tatsache trieb mich zur vorliegenden experimentellen Untersuchung über den Ausfall und die Steigerung der Funktion dieses Organs.

Experimenteller Teil.

A. ÜBER DEN BLUTZUCKERGEHALT.

Versuchsmethode.

Als Versuchstiere wählte ich gesunde männliche ausgewachsene Kaninchen von ca. 2 kg., welche wochenlang mit Unohana gefüttert worden waren. Die totale Schilddrüsenexstirpation: Bei den obenerwähnten Tieren, nach 24 Stunden langem Hunger, wurde der Blutzuckergehalt nach Hagedorn-Jensen bestimmt, und danach wurde 20 ccm einer 25%igen wässerigen Traubenzuckerlösung mittels Schlundsonde in den Magen eingeführt, und der Blutzuckergehalt wurde halbstündlich 3 Stunden lang bestimmt. Einige Tage später wurde der Zuckerbelastungsversuch noch einmal ausgeführt. Darauf wurden die Tiere nach der Regel operiert. Mit Rücksicht auf den Einfluss der Operationswunde wurde der Zuckerbelastungsversuch wenigstens 5 Tage nach der Operation ausgeführt, nämlich bei einer Gruppe Tiere einmal 5 bis 10 Tage nach der Operation und wieder einige Tage später (nach

der Operation kürzere Zeit beobachtete Fälle), und bei einer anderen Gruppe Tiere einmal 5 bis 10 Tage nach der Operation und danach mehrmals bis zu ca. 2 Monate später (nach der Operation längere Zeit beobachtete Fälle). Die Darreichung der Schilddrüsenpräparate: Um Hyperthyreoidismus zu verursachen, verwandte ich als Organpräparat "Thyreoidin" aus der Sankio-Fabrik, und als künstlich hergestelltes Präparat "Thyroxin" Roche.

Vor und nach der Behandlung mit den Schilddrüsenpräparaten wurde der Blutzuckergehalt je zweimal zu bestimmter Zeit gleichermassen bestimmt. Aus Thyreoidin wurde eine Emulsion gemacht und den 3 Gruppen täglich 0,05 bzw. 0,1 und 0,2 g. gegeben. Bei Thyroxindarreichung wurden die Tiere in 2 Gruppen geteilt, deren einer täglich 0,01 mg, der anderen 0,25 mg subkutan eingespritzt wurden.

Ergebnisse.

1. Blutzuckergehalt kürzere Zeit nach der totalen Thyreoidektomie (Tabelle I).

Die Blutzuckerwerte vor und nach der Operation miteinander vergleichend, wurde gefunden, dass in vier unter den fünf Fällen, ausgenommen Nr. 3, der maximale Blutzuckergehalt durchschnittlich ein wenig erhöht war, was die etwaige Abnahme der Zuckerasimulationskraft zeigt.

2. Blutzuckergehalt längere Zeit nach der totalen Thyreoidektomie (Tabelle II).

Mit Rücksicht auf die klimatischen Schwankungen des Blutzuckergehalts wurden die thyreoidektomierten Tiere Nr. 97, 80, 36 je mit den unbehandelten Tieren Nr. 46, 72, 75 kontrolliert. Das Kontrolltier Nr. 46 zeigte von März bis Mai die Neigung zu langsam fortschreitender Zunahme des Blutzuckergehalts, während die thyreoidektomierten Tiere Nr. 97 nach der Operation eine sich allmählich entwickelnde Abnahme desselben und Vermehrung des Körpergewichts zeigten. Beim Kontrolltiere Nr. 75, sank der Blutzuckergehalt ein wenig ab, und beim Kontrolltiere Nr. 72, wegen der starken Schwankungen des Blutzuckergehalts, war es nicht möglich, Zu- oder Abnahme desselben festzustellen. Bei dem

TABELLE I.

Nr. u. Geschl. d. Kaninchens	Körper- gewicht (kg)	Versuchs- datum	Eingriff	Blutzucker (%)						Mittelzahl des maximalen Blutzucker- gehaltes
				Vor d. Zucker- zufuhr	nach d. Zuckerzufuhr					
					1/2 St	1 St.	1,5. St.	2 St.	3 St.	
1 ♂	1,85	23/V	am 28/V total thy- reoidek- tomiert	0,075	0,158	0,171	0,214	0,202	0,166	0,207
	1,86	25/V		0,098	0,132	0,173	0,195	0,200	0,180	
	2,06	4/VI		0,089	0,122	0,176	0,208	0,219	0,193	
	1,93	10/VI		0,084	0,123	0,139	0,162	0,197	0,212	0,216
2 ♂	2,20	23/V	am 28/V total thy- reoidek- tomiert	0,091	0,130	0,166	0,185	0,193	0,175	0,169
	2,02	25/V		0,080	0,107	0,139	0,141	0,144	0,128	
	2,22	4/VI		0,087	0,124	0,195	0,219	0,250	0,216	
	2,17	10/VI		0,088	0,128	0,135	0,137	0,144	0,117	0,197
3 ♂	2,06	27/V	am 29/V total thy- reoidek- tomiert	0,107	0,008	0,159	0,179	0,209	0,199	0,219
	2,01	24/V		0,091	0,126	0,186	0,220	0,229	0,199	
	2,26	4/VI		0,093	0,115	0,157	0,182	0,180	0,198	
	2,31	12/VI		0,098	0,185	0,147	0,185	0,196	0,200	0,199
4 ♂	1,76	27/V	am 29/V total thy- reoidek- tomiert	0,100	0,141	0,195	0,201	0,218	0,163	0,210
	1,84	29/V		0,090	0,126	0,179	0,197	0,202	0,161	
	1,76	1/VI		0,105	0,160	0,223	0,227	0,206	0,137	
	1,84	12/VI		0,099	0,147	0,200	0,219	0,203	0,153	0,213
5 ♂	1,87	5/VI	am 10/VI total thy- reoidek- tomiert	0,072	0,126	0,170	0,166	0,153	0,144	0,179
	1,93	8/VI		0,079	0,132	0,148	0,188	0,154	0,139	
	2,02	15/VI		0,085	0,122	0,155	0,180	0,191	0,156	
	2,05	21/VI		0,092	0,118	0,177	0,159	0,163	0,137	0,184

TABELLE II.
Kontrolltiere.

Nr. u. Geschl. d. Kaninchens	Körper- gewicht(kg)	Versuchs- datum	Blutzucker(%)					
			Vor d. Zucker- zufuhr	nach d. Zuckerzufuhr				
				1/2 St.	1 St.	1,5 St.	2 St.	3 St.
46 ♂	2,17	30/3	0,106	0,157	0,185	0,172	0,172	0,117
	2,19	2/4	0,123	0,187	0,211	0,225	0,193	0,142
	2,10	8/4	0,112	0,155	0,197	0,210	0,169	0,102
	2,13	22/5	0,077	0,172	0,238	0,250	0,212	0,097
75 ♂	2,45	22/8	0,083	0,155	0,198	0,215	0,178	0,150
	2,45	1/9	0,098	0,176	0,221	0,255	0,230	0,180
	2,35	5/10	0,127	0,156	0,197	0,193	0,193	0,155
	2,42	5/11	0,105	0,176	0,235	0,219	0,180	0,135
	2,35	27/11	0,095	0,134	0,166	0,171	0,162	0,130
72 ♂	2,08	22/8	0,064	0,129	0,132	0,139	0,139	0,110
	1,95	1/9	0,091	0,135	0,213	0,209	0,191	0,150
	2,15	5/10	0,125	0,138	0,181	0,200	0,185	0,134
	2,25	5/11	0,095	0,153	0,233	0,216	0,214	0,150
	2,22	27/11	0,090	0,179	0,189	0,189	0,184	0,160

Nr. u. Geschl. d. Kaninchens	Körper- gewicht(kg)	Versuchs- datum	Leber		
			Gewicht (g)	Glykogen (g%)	Fett (p%)
46	2,14	1/7	53	5,15	2,89
75	2,40	8/XII	73	2,85	3,44
72	2,35	9/XII	54	3,52	4,97
im Mittel			60	3,54	3,76

Thyreoidektomierte Tiere

Nr. u. Geschl. d. Kaninchens	Körper- gewicht (kg)	Versuchs- datum	Blutzucker (%)						Eingriff
			Vor d. Zucker- zufuhr	nach d. Zuckerzufuhr					
				1/2 St.	1 St.	1,5 St.	2 St.	3 St.	
97 ♂	2,40	2/2	0,110	0,117	0,121	0,151	0,182	0,142	am 15/2 total thyre- oidekto- miert
	2,29	14/2	0,105	0,156	0,169	0,187	0,180	0,153	
	2,44	27/2	0,109	0,144	0,191	0,176	0,153	0,120	
	2,39	4/3	0,105	0,105	0,155	0,180	0,180	0,136	
	2,80	16/V	0,093	0,141	0,130	0,126	0,137	0,110	
	2,80	27/V	0,070	0,093	0,093	0,141	0,141	0,088	
80 ♂	2,65	10/9	0,118	0,152	0,170	0,166	0,150	0,120	am 22/9 total thyre- oidekto- miert
	2,67	18/9	0,109	0,167	0,223	0,171	0,151	0,125	
	2,68	2/X	0,080	0,134	0,165	0,134	0,104	0,097	
	2,80	26/X	0,085	0,131	0,141	0,128	0,110	0,105	
	2,45	6/XI	0,080	0,162	0,212	0,197	0,141	0,123	
	2,43	20/XI	0,102	0,187	0,240	0,224	0,167	0,135	
36 ♂	2,17	10/9	0,091	0,147	0,170	0,156	0,130	0,110	am 22/9 total thyre- oidekto- miert
	2,16	18/9	0,098	0,166	0,187	0,225	0,204	0,170	
	2,00	2/X	0,100	0,139	0,217	0,243	0,136	0,110	
	2,35	26/X	0,088	0,113	0,122	0,131	0,131	0,115	
	2,20	6/XI	0,075	0,121	0,206	0,231	0,212	0,165	
	2,15	20/XI	0,096	0,149	0,194	0,257	0,242	0,160	

Nr. u. Geschl. d. Kaninchens	Körper- gewicht (kg)	Versuchs- datum	Leber		
			Gewicht (g)	Glykogen (g%)	Fett (g%)
80	2,55	9/XII	55	2,31	4,48
36	2,20	8/XII	63	3,86	3,75
97	2,86	1/VII	76	4,4	4,3
im Mittel			63	3,52	4,17

schilddrüsenlosen Tier Nr. 36 scheint der Blutzuckergehalt zugenommen zu haben, trotz aller Schwankungen desselben. Kurz ist das folgende zu sagen: Die Kraft Zucker zu assimilieren wird durch die Entfernung der Schilddrüse keineswegs beträchtlich beeinflusst.

3. Bei den mit 0,5 ccm von 10% iger Thyreoidinemulsion (0,05 g Thyreoidin) behandelten Tieren (Tabelle III).

TABELLE III.

Nr. u. Geschl. d. Kaninchens	Körper- gewicht (kg)	Versuchs- datum	Behandlung	Blutzucker (%)						Mittelzahl des maximalen Blutzucker- gehaltes
				Vor d. Zucker- zufuhr	nach d. Zuckerzufuhr					
					1/2 St.	1 St.	1,5 St.	2 St.	3 St.	
6 ♂	1,94	29/7	Seit 6/8 täglich	0,100	0,159	0,214	0,219	0,244	0,168	0,238
	1,95	1/8	0,5ccm von	0,102	0,171	0,230	0,231	0,199	0,135	
	1,98	12/8	10% Thy- reoidin-	0,098	0,146	0,193	0,218	0,188	0,150	0,217
	1,95	19/8	emulsion	0,091	0,175	0,216	0,184	0,168	0,134	
7 ♂	1,87	29/7	Seit 3/8 täglich	0,103	0,164	0,233	0,244	0,235	0,225	0,258
	1,90	1/8	0,5ccm von	0,098	0,179	0,224	0,271	0,253	0,201	
	1,94	12/8	10% Thy- reoidin-	0,093	0,141	0,178	0,193	0,178	0,128	0,225
	1,75	19/8	emulsion	0,107	0,190	0,257	0,241	0,216	0,156	
8 ♂	1,95	30/7	Seit 6/8 täglich	0,086	0,143	0,170	0,178	0,149	0,218	0,227
	1,81	3/8	0,5ccm von	0,089	0,133	0,169	0,235	0,159	0,126	
	1,80	15/8	10% Thy- reoidin-	0,083	0,143	0,146	0,144	0,146	0,102	0,181
	1,95	19/8	emulsion	0,091	0,175	0,216	0,184	0,168	0,134	

Vor der Thyreoidinzufuhr der mit Unohana gefütterten Tiere wurde der Zuckerbelastungsversuch zwei mal ausgeführt, danach wurden die Tiere jeden Tag mit der oben erwähnten Emulsion per os mittels Schlundsonde gefüttert, und einmal 10 Tage danach und weiter noch einmal einige Tage später wurde der Zuckerbelastungsversuch ausgeführt. Hierbei war eine Veränderung des Körpergewichts nicht nachweisbar. Das Ergebniss ist folgendes. Bei allen 3 Tieren nahm der maximale Blutzuckergehalt, wenn auch nicht viel, ab. Die obigen Tatsachen führen zum Schluss, dass die Zuckerassimilation durch die Thyreoidindarreichung

erhöht wird, obwohl nur ein wenig.

4. Bei den mit 1,0 ccm von 10%iger Thyreoidinmulsion (0,1 g Thyreoidin) behandelten Tieren (Tabelle IV).

TABELLE IV.

Nr. u. Geschl. d. Kaninchens	Körpergewicht (kg)	Versuchsdatum	Behandlung	Blutzucker						Mittelzahl des maximalen Blutzucker- gehaltes
				Vor d. Zucker- zufuhr	nach d. Zuckerzufuhr					
					1/2 St.	1 St.	1,5 St.	2 St.	3 St.	
9 ♂	2,34	26/6	Seit 6/7 täglich	0,098	0,177	0,239	0,163	0,237	0,188	0,198
	2,30	4/7	1 ccm von	0,136	0,150	0,157	0,143	0,143	0,134	
	1,55	18/7	10% Thy- reoidin-	0,098	0,171	0,197	0,159	0,152	0,113	0,191
	1,95	20/7	emulsion	0,103	0,157	0,177	0,185	0,141	0,106	
10 ♂	2,13	27/6	Seit 2/7 täglich	0,086	0,175	0,220	0,231	0,220	0,166	0,230
	2,25	1/7	1 ccm von	0,081	0,164	0,318	0,229	0,206	0,162	
	1,84	11/7	10% Thy- reoidin-	0,104	0,173	0,164	0,130	0,105	0,095	0,174
	1,58	16/7	emulsion	0,121	0,175	0,174	0,161	0,148	0,118	
11 ♂	2,13	27/6	Seit 4/8 täglich	0,099	0,141	0,159	0,177	0,196	0,138	0,191
	1,79	5/8	1 ccm von	0,109	0,122	0,185	0,170	0,138	0,116	
	1,76	10/8	10% Thy- reoidin-	0,113	0,156	0,150	0,134	0,127	0,102	0,163
	1,75	13/8	emulsion	0,090	0,170	0,157	0,150	0,139	0,095	

Bei den 3 Fällen trat Abnahme des Körpergewichts, und bei Nr. 9 ausserdem Diarrhoe auf. Der maximale Blutzuckergehalt sank durchschnittlich ab. Es folgt daraus, dass die Zuckerassimilationskraft hierbei stieg.

5. Bei den mit 2,0 ccm von 10%iger Thyreoidin-Wasseremulsion (0,2 g Thyreoidin) behandelten Tieren (Tabelle V).

Bei allen 3 Tieren trat Abnahme des Körpergewichts nebst Diarrhoe auf, und die maximalen mittleren Blutzuckerwerte zeigten auffallende Hochwerte, was das Vorhandensein hochgradiger Zuckerassimilationsstörung zeigt.

6. Bei der subkutanen Injektion von pro kg. 0,01 mg Thyroxin (Tabelle VI).

Hierbei wurde keine Verschiebung des Körpergewichts nachgewiesen. Die maximale Blutzuckerwerte waren bei Nr. 15 etwas

TABELLE V.

Nr. u. Geschl. d. Kaninchens	Körpergewicht (kg)	Versuchsdatum	Behandlung	Blutzucker						Mittelzahl des maximalen Blutzucker- gehaltes
				Vor d. Zucker- zufuhr	nach d. Zuckerezufuhr					
					1/2 St.	1 St.	1,5 St.	2 St.	3 St.	
12 ♀	2,01	10/7	Seit 4/7	0,088	0,123	0,213	0,186	0,184	0,190	0,182
	2,07	13/7	täglich							
	1,94	17/7	2 cc von							
	1,57	22/7	10% Thy- reoidin- emulsion							
13 ♀	1,84	28/6	Seit 14/7	0,087	0,144	0,167	0,156	0,142	0,140	0,151
	1,82	13/7	täglich							
	1,77	18/7	2 cc von							
	1,72	20/7	10% Thy- reoidin- emulsion							
14 ♂	2,02	30/7	Seit 4/8	0,097	0,140	0,180	0,195	0,120	0,180	0,212
	2,00	3/8	täglich							
	1,70	4/8	2 cc von							
	1,60	13/8	10% Thy- reoidin- emulsion							

TABELLE VI.

Nr. u. Geschl. d. Kaninchens	Körpergewicht (kg)	Versuchsdatum	Behandlung	Blutzucker					Mittelzahl des maximalen Blutzucker- gehaltes	
				Vor d. Zucker- zufuhr.	nach d. Zuckerezufuhr					
					1/2 St.	1 St.	1,5 St.	2 St.		3 St.
15 ♀	2,57	28/8	Seit 12/9 pro kg 0,01 mg Thyro- xin täglich subkutan injiziert	0,108	0,142	0,160	0,164	0,157	0,124	0,166
	2,55	5/9		0,095	0,134	0,163	0,163	0,168	0,150	
	2,55	18/9		0,093	0,137	0,175	0,171	0,182	0,166	
	2,45	20/9		0,113	0,163	0,192	0,185	0,127	0,138	
16 ♀	2,55	2/10	Seit 7/X pro kg 0,01 mg Thyro- xin täglich subkutan injiziert	0,106	0,145	0,175	0,224	0,199	0,124	0,238
	2,56	5/10		0,105	0,177	0,252	0,223	0,173	0,089	
	2,62	15/10		0,099	0,174	0,235	0,241	0,192	0,188	
	2,59	19/10		0,103	0,190	0,245	0,221	0,137	0,084	
17 ♀	2,48	2/10	wie Nr. 16	0,102	0,104	0,150	0,190	0,161	0,148	0,185
	2,49	5/10		0,102	0,155	0,180	0,180	0,135	0,080	
	2,45	15/10		0,090	0,156	0,163	0,150	0,127	0,079	
	2,42	19/10		0,088	0,168	0,157	0,121	0,071	0,066	

erhöht, bei Nr. 16 fast unverändert, und nahmen bei Nr. 17 ein wenig ab. Diese Ergebnisse bei Nr. 17 stimmen überhaupt mit denen bei der oralen Darreichung von Thyreoidin in kleinen Dosen überein.

7. Bei der subkutanen Injektion von pro kg. 0,25 mg Thyroxin (Tabelle VII).

TABELLE VII.

Nr. u. Geschl. d. Kaninchens	Körpergewicht (kg)	Versuchsdatum	Behandlung	Blutzucker						Mittelzahl des maximalen Blutzucker- gehaltes
				Vor d. Zucker- zufuhr.	nach d. Zuckerzufuhr					
					1/2 St.	1 St.	1,5 St.	2 St.	3 St.	
18 ♂	2,50	3/10	Seit 10/X 0,25 mg pro kg Thyroxin subkutan injiziert	0,121	0,128	0,162	0,176	0,187	0,164	0,166
	2,57	9/10		0,090	0,120	0,131	0,145	0,145	0,092	
	2,00	14/10		0,154	0,279	0,308	0,304	0,257	0,170	0,300
	1,81	16/10		0,151	0,253	0,271	0,292	0,259	0,201	
19 ♂	2,10	7/10	wie Nr. 18.	0,102	0,154	0,206	0,225	0,217	0,165	0,196
	2,15	9/10		0,092	0,127	0,140	0,167	0,145	0,100	
	1,93	14/10		0,102	0,222	0,239	0,215	0,168	0,148	0,240
	1,90	16/10		0,089	0,203	0,241	0,228	0,173	0,107	
20 ♂	2,210	29/8	Seit 12/9 0,25 mg pro kg Thyroxin subkutan injiziert	0,063	0,136	0,165	0,186	0,173	0,115	0,183
	2,08	3/9		0,095	0,172	0,197	0,179	0,150	0,095	
	1,75	17/9		0,095	0,170	0,243	0,215	0,181	0,083	0,227
	1,54	21/9		0,099	0,203	0,211	0,168	0,113	0,092	

Bei allen 3 Tieren trat Abnahme des Körpergewichts nebst Diarrhoe auf, und die maximalen. Blutzuckerwerte zeigten deutlich höhere Werte als bei 0,2 g Thyreoidin. Hier ist hochgrade Störung der Zuckerassimilation sicher vorhanden.

B. ÜBER DEN LEBERGLYKOGEN- U. LEBERFETTGEHALT.

Die Hauptversuchsergebnisse wurden mit unbehandelten Kaninchen kontrolliert. Hierbei wurde sorgfältig berücksichtigt, dass bei der Leber die klimatischen Schwankungen des Glykogengehalts nicht gering sind.

Versuchsmethode.

Kontrollversuch.

Den Tieren, die wochenlang mit Unohana gefüttert worden waren, wurde eines Tages um 3 Uhr nachm. 50 ccm von 25% iger Traubenzuckerlösung mittels Schlauchsonde in den Magen eingeführt, ohne dass die Kaninchen seit 9 Uhr vorm. desselben Tages mit irgendwelchem Stoff gefüttert worden wären. Ferner am folgenden Tag um 9 Uhr vorm. wurde die gleiche Dosis Traubenzuckerlösung gleicherweise gegeben. Die Tötung erfolgte um 3 Uhr nachm. desselben Tages durch Luftembolie, und ihre Lebern wurden möglichst schnell und bald darauf zur Bestimmung entnommen.

Hauptversuch.

Das Hervorrufen von Hyper- u. Athyreoidismus erfolgte gleicherweise wie bei der Blutzuckerbestimmung, und das nachherige Verfahren wurde auf dieselbe Weise wie bei den Kontrolltieren ausgeführt. Zur Bestimmung des Leberglykogengehalts wurden die Methoden von Mori-Iwasaki und von Hagedorn-Jensen kombiniert verwendet. Das Leberfett wurde wie folgt bestimmt.

5 g Leberbrei wurde mit absolutem Alkohol gut gemischt und filtriert (Alkohol-Extrakt.) Der Rückstand wurde getrocknet, staubfein pulverisiert und dann mit reinem Äther mittels des Soxhlet'schen Apparates extrahiert (Äther-Extrakt). Der Alkohol-Extrakt wurde wieder mit Alkohol-Äther-Gemisch (3:1) extrahiert. Endlich wurde dieser Alkohol-Äther-Extrakt zum Äther-Extrakt addiert, und wieder mit reinem Äther extrahiert. Der auf solche Weise hergestellte Äther-Extrakt wurde zur Gewichtskonstanz in einem Exsikkator getrocknet und zur Wägung gebracht.

Ergebnisse.

1) Bei den nach der Operation nur kürzere Zeit lang beobachteten Fällen. Über das Leberglykogen:—

Wie in Tabelle VIII. u. Tabelle IX. gezeigt, betrug der Mittelwert des Leberglykogengehalts aller 5 Kontrolltiere 3.07%, und

TABELLE VIII.

Nr. u. Geschl. d. Kaninchens	Körperge- wicht (kg)	Versuchs- datum	Blutzucker %	Leber	
				Glykogen (g%)	Gewicht (g)
21 ♂	2,15	28/5	0,068	3,5	62,5
22 ♂	2,62	28/5	0,081	3,39	67,5
23 ♂	2,08	12/6	0,085	2,10	55,0
24 ♂	2,30	12/6	0,078	3,14	62,5
25 ♂	2,50	18/6	0,093	3,23	54,0
im Mittel	2,50		0,081	3,07	60,3

TABELLE IX.

Nr. u. Geschl. d. Kanin- chene	Körper- gewicht (am Versu- chstage) (kg)	Versuchs- datum.	Blutzucker (%)	Leber		Bemerkung
				Glykogen (g%)	Gewicht (g)	
26 ♂ (2.29 kg)	2,34	29/5	0,103	2,78	64	am 13/V thyreoidek- tomiert
27 ♂ (2.73 kg)	3,00	29/5	0,070	2,62	84	"
28 ♂ (2.22 kg)	2,33	11/6	0,086	2,39	75	am 28/V
29 ♂ (2.41 kg)	2,39	11/6	0,097	3,20	61	"
30 ♂ (2.10 kg)	2,25	18/6	0,103	3,93	65	am 1/6
31 ♂ (2.35 kg)	2,52	19/6	0,077	4,17	76	"
Im Mittel			0,089	3,18	70,8	

der aller 6 thyreoidektomierten Tiere im Verlauf von 2 Wochen 3,18%, es wurde also kein auffallender Unterschied zwischen den beiden Werten gesehen.

Über das Leberglykogen u. das Leberfett:—

Wie in Tabelle X. u. Tab. XI. gezeigt, waren die Mittelwerte des Leberglykogen- u. Leberfettgehalts der 16 Kontrolltiere je 2,86% und 3,15%, während die der 4 thyreoidektomierten Tiere

TABELLE X.

Nr. u. Geschl. d. Kanin- chens	Körper- gewicht (kg)	Versuchs- datum	Leber		
			Glykogen (g%)	Fett (g%)	Gewicht (g)
32 ♂	2,63	29/10	1,87	4,13	65,0
33 ♂	2,35	29/10	2,73	4,17	61,0
34 ♂	2,30	30/10	2,72	2,89	63,5
35 ♂	2,38	30/10	2,82	2,87	66,0
36 ♂	2,67	31/10	1,42	3,68	72,5
37 ♂	2,67	31/10	2,07	3,48	84,5
38 ♂	2,15	26/11	2,57	3,44	56,0
39 ♂	2,37	26/11	4,15	3,31	71,0
40 ♂	2,25	27/11	3,04	2,91	60,0
41 ♂	2,55	27/11	5,59	2,68	75,5
42 ♂	2,01	28/11	1,27	2,64	56,5
43 ♂	1,95	28/11	2,84	2,76	48,5
44 ♂	2,25	12/12	3,16	2,63	56,0
45 ♂	2,16	12/12	2,47	3,11	72,0
46 ♂	2,06	16/12	1,41	3,05	64,5
47 ♂	2,12	17/12	4,74	2,71	54,0
im Mittel			2,86	3,15	62,3

im Verlauf von ca. 2 Wochen nach der Operation je 2,48 g% und 3,07 g% betrugen. Kurz gesagt, innerhalb kürzerer Zeit nach der Operation neigt das Leberglykogen zur Abnahme und der Leberfettgehalt bleibt fast unverändert.

2) Bei längerdauernder Beobachtung nach der Thyreoidektomie.

Über das Leberglykogen:—

Wie in Tabelle XII zusammengestellt, betrug der Mittelwert des Leberglykogengehalts der 2 Kontrolltiere 2,74% und derjenige der 2 thyreoidektomierten Tiere 2 Monate nach der Operation 4,34 g%, was eine deutliche Zunahme bei Thyreoidektomie zeigt.

Über das Leberglykogen und das Leberfett:—

Wie in Tabelle II gezeigt, waren die Mittelwerte des Leberglykogen- und Leberfettgehalts der 3 Kontrolltiere je 3,54 g% und

TABELLE XI.

Nr. u. Geschl. d. Kaninchens	Körper- gewicht (kg)	Versuchs- datum	Behandlung	Leber		
				Glykogen (g%)	Fett (g%)	Gewicht (g)
48 ♂	2,25	14/11	am 6/4 nach Wägung d. K.G. (2 kg) thy- reidektomiert	2,17	3,33	71,0
49 ♂	1,71	14/11	am 6/XI nach Wägung d. K.G. (2 kg) thy- reidektomiert	1,45	2,70	48,5
50 ♂	2,22	10/12	am 25/XI nach Wägung d. K.G. (2.12 kg) thyreidekt- omiert	1,27	3,35	64,0
51 ♂	2,24	10/12	am 25/XI nach Wägung d. K.G. (2.03 kg) thyreidekt- omiert	5,02	2,88	76,0
Im Mittel				2,48	3,07	64,9

TABELLE XII.

Nr. u. Geschl. d. Kaninchens	Körper- gewicht (kg)	Versuchs- datum	Eingriff	Blutzucker	Leber	
					Glykogen (%)	Gewicht (g)
52 ♂	2,25	13/9	am 22/VII nach Wägung d. K.G. (2.04kg) thyreidektom	0,096	5,20	57
53 ♂	2,50	13/9	am 24/7 nach Wägung d. K.G. (2.42 kg) thyreidektom.	0,068	3,47	70
Im Mittel				0,082	4,34	64
54 ♂	2,68	17/9	unbehandelt	0,076	1,51	74
55 ♂	2,83	17/9	„	0,085	3,97	69
Im Mittel				0,081	2,74	71,5

3,76 g% und diejenigen der operierten Tiere je 3,52 g% und 4,17 g%. Es gibt also für den Leberglykogengehalt keinen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Gruppen, während der Leberfettgehalt mässig zunahm.

3) Die Versuchsergebnisse über das Verhalten des Leberglykogens und des Leberfettes bei Tieren mit hyperfunktionierter Schilddrüse.

a. Bei täglich mit 0,5 ccm von 10%iger Thyreoidinemulsion (0,05 g Thyreoidin) behandelten Tieren.

Der ca. eine Woche nach der Thyreoidindarreichung gleichermassen bestimmte Leberglykogen- und Leberfettgehalt der 4 Versuchstiere zeigte gegenüber dem der kontrollierte Zunahme des Leberglykogens (von 2,86 g% auf 3,57 g%) und Abnahme des Leberfettes (von 3,15 g% auf 2,59 g%) (Tabelle X und Tabelle XIII).

TABELLE XIII.

Nr. u. Geschl. d. Kaninchens	Versuchs- datum	Körper- gewicht (kg)	Behandlung	Leber		
				Glykogen (g%)	Fett (g%)	Gewicht (kg)
56 ♂ (K.G. 2.0 kg)	5/12	1,78	Seit 28/XI 10 % Thyreoidin- emulsion täg- lich 0.5 ccm	3,52	2,68	47,5
57 ♂ (K.G. 2.17kg)	5/12	1,99	"	3,57	3,00	62,0
58 ♂ (K.G. 2.39kg)	17/12	1,90	Seit 9/XII	2,42	2,56	62,5
59 ♂ (K.G. 2.11kg)	17/12	1,62	"	4,77	2,12	65,0
Im Mittel				3,57	2,59	59,3

b. Bei den mit 1,0 ccm (0,1 g) von 10%iger Thyreoidinemulsion (0,1 g Thyreoidin) behandelten Tieren.

Wie in Tabelle XIV. zusammengestellt, sank das Körpergewicht der Versuchstiere, und die Mittelwerte des Leberglykogen- und Leberfettgehalts betrugen je 1,32 g% und 2,62 g%, was ein beträchtliches Sinken des Leberglykogengehalts und ein mässiges Sinken des Leberfettgehalts bekundet.

TABELLE XIV.

Nr. K.G. u. Geschl. d. Kaninchens	Versuchs- datum	Körper- gewicht (kg)	Behandlung	Leber		
				Glykogen (g%)	Fett (g%)	Gewicht (g)
60 ♂ (2.26 kg)	20/11	1,97	Seit 12/XI 10 % Thyreoidin- emulsion täg- lich 1 cem	1,43	3,17	73
61 ♂ (1.8 kg)	3/12	1,38	Seit 25/XI	1,33	2,15	37,5
62 ♂ (2.1 kg)	5/12	2,10	"	1,21	2,55	66,5
Im Mittel				1,32	2,62	59,0

c. Bei den mit 2,0 cem von 10%iger Thyreoidinemulsion (0,2 g Thyreoidin) per os behandelten Tieren.

Hier sieht man aus der Tabelle XV. das folgende. Alle drei Versuchstiere zeigten Gewichtsabnahme nebst Diarrhoe, und ihr Leberglykogen und Leberfett betrugen, ungefähr eine Woche nach der Operation bestimmt, je 2,22 g%, und 2,92 g%. Der Tabelle X. gegenüber ergibt sich eine Abnahme des Leberglykogengehalts, während der Leberfettgehalt nicht stark beeinflusst zu sein scheint.

d. Bei den mit per kg 0,01 mg Thyroxin subkutan injizierten Tieren. (Tabelle XVI).

TABELLE XV.

Nr. K.G. u. Geschl. d. Kaninchens	Versuchs- datum	Körper- gewicht (kg)	Behandlung	Leber		
				Glykogen (g%)	Fett (g%)	Gewicht (g)
63 ♂ (2.0 kg)	13/11	1,30	Seit 6/XI 10 % Thyreoidin- emulsion täg- lich 2 cem	0,79	2,45	41,5
64 ♂ (2.42 kg)	15/11	1,90	Seit 9/XI	3,09	3,76	55,5
65 ♂ (2.34 kg)	16/12	1,95	"	2,80	2,56	59,5
Im Mittel				2,22	2,92	53,2

TABELLE XVI.

Nr. K.G. u. Geschl. d. Kaninchens	Versuchs- datum	Körper- gewicht (kg)	Behandlung	Leber		
				Glykogen (g%)	Fett (g%)	Gewicht (g)
63 ♂ (2.5 kg)	20/11	2,25	Seit 14/XI 0.01 mg Thyro- cin pro kg täg- lich	1,72	3,34	63,0
64 ♂ (2,4 kg)	21/11	2,29	"	1,47	2,76	77,5
65 ♂ (2.36 kf)	3/12	2,19	Seit 25/XI "	4,36	3,04	59,0
Im Mittel				2,85	3,04	66,5

Nach Ablauf von ca. 1 Woche entstand keine Veränderung im Körpergewicht, und auch betreffs des Leberglykogen- und Leberfettgehalts im Vergleich mit Tabelle X war keine Verschiebung nachzuweisen, denn sie betrugen in Tabelle X je 2,86% und 3,15 g%.

e. Bei den mit per kg 0,25 mg Thyroxin subkutan injizierten Tieren. Wie in Tabelle XVIII zusammengestellt, zeigten der

TABELLE XVII.

Nr. K.G. u. Geschl. d. Kaninchens	Versuchs- datum	Körper- gewicht (kg)	Behandlung	Leber		
				Glykogen (g%)	Fett (g%)	Gewicht (g)
66 ♂ (2.46 kg)	13/11	1,68	Seit 6/XI pro g 0.25 mg Thy- roxin täglich	0,99	2,01	55
67 ♂ (2.13 kg)	15/11	1,70	Seit 9/XI "	1,93	2,74	72,5
68 ♂ (2.25 kg)	19/11	2,95	Seit 13/XI "	1,31	2,85	74,5
69 ♂ (2.27 kg)	13/12	1,83	Seit 8/XII "	1,63	2,99	66,5
70 ♂ (2.10 kg)	13/12	1,61	"	2,83	2,29	51,5
71 ♂ (2.24 kg)	13/12	1,85	"	2,42	2,87	50,5
Im Mittel				1,85	2,62	59,0

Leberglykogen- und Leberfettgehalt ca. 1 Woche nach der Darreichung im Mittel je 1,85 g% und 2,62%, d. h. hierbei nahm der Leberglykogengehalt gegenüber Tabelle X. erheblich ab, und auch der Leberfettgehalt zeigte eine mässige Abnahme.

ZUSAMMENFASSUNG MIT BESPRECHUNG.

Fasse ich hier alle Versuchsergebnisse zusammen, so ergibt sich das folgende:

1) Die Fähigkeit des Organismus, Zucker zu assimilieren, ist kürzere Zeit nach der totalen Thyreoidektomie schwächer als vor derselben, trotzdem das Leberglykogen, so wie auch das Leberfett, keine beträchtliche Verschiebung zeigt. Also, was den Blutzuckergehalt betrifft, stimmen meine Versuchsergebnisse mit denjenigen der Vorläufer nicht überein, sondern stehen vielmehr diesen gegenüber; betreffs des Leberglykogens und Leberfettes aber bin ich mit den Ergebnissen Brittons und Meyers einig.

2) Längere Zeit nach der totalen Thyreoidektomie zeigte der Blutzuckergehalt nach Zuckerbelastung keine auffallende Veränderung gegenüber dem Zustand vor der Operation; der Leberfettgehalt zeigte eine Tendenz zur mässigen Anreicherung, während aus der Leberglykogenbestimmung deswegen kein eindeutiges Resultat zu gewinnen war, weil einige Versuchstiere eine Tendenz zur mässigen Abnahme und andere eine erhebliche Vermehrung zeigten. Also, obwohl Kuriyama die Abnahme des Leberglykogengehalts, und Siegel, Riu, und Murao seine Zunahme behaupteten, war durch meine Versuche keine eindeutige Tendenz festzustellen.

3) Bei den mit kleinen Dosen Thyreoidin behandelten Tieren sank der Blutzuckergehalt ein wenig ab, sowie auch bei einem mit einer kleinen Dosis Thyroxin subkutan injizierten Tiere. Ferner wurde der Glykogengehalt durch kleine Dosen Thyroxin keineswegs deutlich beeinflusst, aber bei der Darreichung kleindosiger Thyreoidinemulsion war eine Tendenz zur Leberglykogenabnahme festzustellen. Bei den mit grossdosiger Thyreoidinemulsion oder Thyroxin behandelten Tieren, wurden Hochwerte des Blutzuckergehalts und deutliche Abnahme des Leberglykogengehalts nach-

gewiesen. Der Leberfettgehalt dabei nahm durch Thyreoidin ein wenig, und durch Thyroxininjektion deutlich ab. Aus dem oben Gesagten kann der Schluss gezogen werden, dass meine Versuchsergebnisse mit denjenigen von Abelin, Kürsteiner, Leites und dessen Mitarbeitern sich decken. Die vorläufige Anschauung scheint berechtigt, dass bei Hyperthyreoidismus es Steigerung der Glykogenolyse und Störung der Glykogensynthesentüchtigkeit gibt. Bei grossdosiger Darreichung der Schilddrüsensubstanzen nimmt der Fettgehalt der Leber in der Regel ab.

SCHLÜSSE.

1. Nicht allzu lange Zeit nach der Thyreoidektomie liegt der Blutzuckergehalt ein wenig erhöht gegen die Kontrollwerte und das Leberglykogen sowie -fett zeigten keine beträchtliche Verschiebung, also ist nur eine leichte Abschwächung der Zuckerassimilationskraft festzustellen.

2. Nach Ablauf längerer Zeit nach der Schilddrüsenentfernung bleiben der Blutzucker- und Leberglykogengehalt nach Zuckerbelastung im grossen und ganzen fast unverändert im Vergleich mit denen vor der Operation, während eine Tendenz zur Leberfettanreicherung sich nachweisen lässt.

3. Bei den mit kleinen Dosen Thyreoidin behandelten Tieren werden mässig niedrigere Blutzuckerwerte gemessen. Leicht vermehrte Leberglykogenwerte und leicht abgesunkener Leberfettgehalt werden nachgewiesen.

4. Bei den mit kleinen Dosen Thyroxin subkutan injizierten Tieren zeigte sich manchmal geringe Abnahme des Blutzuckergehalts. Der Leberglykogen- und Leberfettgehalt zeigen keine Verschiebung.

5. Bei mit grossen Dosen Thyroxin subkutan injizierten Tieren erhöht sich der Blutzuckergehalt, während das Leberglykogen und der Leberfettgehalt abnehmen.

6. Bei mit grossen Dosen Thyreoidin behandelten Tieren erhöht sich der Blutzuckergehalt und nehmen der Leberglykogengehalt sowie der Leberfettgehalt ein wenig ab.

7. Das Körpergewicht bleibt bei den thyreoidektomierten

Tieren im grossen und ganzen während der Versuchsperiode unverändert, hingegen vermindert es sich durch grossdosige Darreichung von Thyroxin oder Thyreoidin.

Zum Schluss fühle ich mich verpflichtet, meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. N. Kageura, meine tiefe Erkenntlichkeit für seine überaus wohlwollende Leitung auszusprechen, und gleichzeitig auch Herrn Dr. Senjin für seine freundliche Unterstützung meinen verbindlichen Dank zu sagen.

LITERATUR.

- Abderhalden, E., u. Wertheimer, E. (1928): Pflügers Arch. **219**, 588.
- Abderhalden, u. Wertheimer, E. (1927): Pflügers Arch. f. d. ges. Phys. **213**, 328; **216**, 697.
- Abderhalden, E. u. Wertheimer, E. (1929): Zeitschr. f. exper. Med. **68**, 1.
- Abelin, J., u. Mitarb. (1920): Biochem. Z., **102**, 39.
- Abelin und Kürsteiner (1928, 1930): ebenda, **198**, 19; **228**, 233.
- Abelin u. Miyazaki, K. (1924): ebenda, **149**, 109.
- Benazzi-Lentati, Giuseppina (1934): Riv. Biol., **16**, 237-244.
- Bodansky, A. u. Mitarb. (1924): Amer. J. physiol., **69**, 498.
- Boe (1914): Bioch. Zeitschr., **64**, 450.
- Bong, E. (1933): Pflügers Arch., **232**, 482.
- Bösl, O. (1928): Biochem., Z., **202**, 299.
- Britton, S. W., u. Myers, W. K. (1928): Amer. J. Physiol., **84**, 132.
- Coggeshall, Howard C. and Janes, A. (1933): Amer. J. Physiol., **105**, 103-109.
- Ders. (1926): ebenda, **174**, 232.
- Fukui, F. (1925): Pflügers Arch., **210**, 410.
- Haendel, M. u. Mumilla, A. (1929): Biochem. Z., **212**, 35.
- Harrington, C. R. u. Salter, W. F. (1930): Biochem. Journ., **24**, 456.
- Hayashi (1921): Zikken-Shokakibyo Zassi, Nr. 2.
- Jeanney u. Isaacson (1917): ebenda.
- Kendall, E. C. u. Simonson, D. G. (1928): Journ. of biol. Chem., **80**, 357.
- Kraus (1921): Deut. med. Wochenschr., Nr. 47, S. 1446.
- Knittel, G. u. Mitarb. (1931): Z. exper. med., **76**, 362.
- Kuriyama (1917): Amer. Jour. of Phys. **43**, 481.
- Leites, S. (1930): Pflügers Arch. f. d. ges. Phys. **221**, 101.
- Magistris, Hugo (1932): Rev. Soc. argent. Biol., 297-305.
- Mark, R. E. (1926): Pflügers Arch., **211**, 521.
- Murao (1931): Nippon-Naibunpitu Zassi, **6**, Nr. 4.

Nakazawa, M. (1930): ebenda, **6**, 66.

Okada: Igaku-Chuo Zassi Nr. 375.

Okada (1921): Nippon-Naikagakkazassi, **9**, Nr. 3.

Oka (1925): Naibunpitu-Zassi, **1**.

Oshima, Z. (1926): Z. exper. med., **64**, 694.

Riu, R.: Arbeitensammlung über Schilddrüse and d. H inn. med. Abteil,
Kyoto, Band I.

Sakurai, Sh. (1930): Jap. J. exper. med. **9**, 15.

Siegel (1929): Klin. Wsehr., 1069.

Stockheim, W. (1931): Pflügers Arch., **228**, 469.

Takafuji (1921): Nippon-Gekagakkazassi, Nr. 2.

Tsuzi (1921): Igaku-Chuoazassi, **19**, 1.

Zung, Edgard, et Jean La Barre (1932): Arch. internat. Physiol.,
35, 286-320.

VERHALTEN DES OCTOPINS UND SEINER ISOMERE GEGEN ARGINASE.

VON

SYŪZO AKASI.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Kyōto,
Vorstand: Prof. Dr. K. Mayeda.)

(Eingegangen am 4. März 1937)

Durch die bisher mehrfach vorgenommenen Untersuchungen, nämlich die von K. Thomas, J. Kapfhammer u. B. Flaschen-träger (1922), S. Edlbacher u. P. Bonem (1925), H. Steib (1926), K. Felix, H. Müller u. K. Dirr (1928) und S. Kamiya (1935), über die Spezifität der Arginase hat sich ergeben, dass diese streng begrenzt ist. Von der Arginase werden *D*-Arginin vollkommen, *DL*-Arginin und Arginylarginin nur zur Hälfte gespalten. Die sonstigen Argininderivate und verwandte Körper mit Ausnahme des *D*- α -Monobenzoylarginins, welches der Angabe von Felix, Müller und Dirr (1928) nach unvollkommen gespalten wird, reagieren auf die Arginasewirkung nicht mit Spaltung. Dieses ganze Verhalten legt die Annahme nahe, dass zum Aufspalten durch Arginase nicht nur die Guanidin- und Carboxylgruppe intakt sein müssen, sondern auch dazu noch die α -Aminogruppe vorhanden sein muss, wobei aber eines der Wasserstoffatome der letzteren Gruppe durch einen Säure- vermutlich auch einen Aminosäurenrest ersetzt sein kann. Es dürfte nun von Interesse sein, die neuerl Argininderivate auf ihr Verhalten gegen Arginase zu prüfen, um damit einerseits zur Spezifitätsfrage des Arginaseferments einen Beitrag zu liefern und andererseits einen Weg zur weiteren Untersuchung der biologischen Bedeutung des Octopins zu zeigen.

Als Substrat verwendete ich das Octopin und seine zwei synthetisch dargestellten Isomere, das Iso-octopin und den β -Isomer, über welche beide ich vor kurzem berichtet habe (1937), und als Ferment tierische Arginase verschiedener Herkunft

(Hund, Kaninchen und Kalb).

Als PH-Optimum für die Spaltung jeden Substrates wurden 9,5 und als für die maximale Spaltung nötige Wirkungszeit ungefähr 72 Stunden festgestellt. Wie eine Reihe von Versuchen in Tabelle I zeigte, fielen alle Proben dem enzymatischen Eingriff anheim. Dabei schien unter den einzelnen Substraten insbesondere im Vergleich mit dem Parallelversuch mit Arginin ein nichtzu-übersehender quantitativer Unterschied der Spaltung zu bestehen. Um zu sehen, ob jedes Substrat seine besondere, von den anderen Substraten verschiedene Spaltbarkeit gegen Arginase besitze, wurde der Versuch derart vorgenommen, dass bei einer gleichbleibenden Substratmenge das Ferment stufenweise vermindert und dabei der Spaltungsvorgang verfolgt wurde. Bei den vergleichenden Untersuchungen ergab sich, dass bei der Anwendung einer genügenden Menge Kaninchenleberextrakts die Spaltung des Iso-octopins und β -Isomers vollkommen wie die des Arginins stattfand, während es beim Octopin zu einer nur unvollkommenen Spaltung kam. Bei weiterer Verminderung war zu bemerken, dass der Spaltungsvorgang bei jedem Substrat abnahm oder sogar ausblieb. Nur beim Parallelversuch mit Arginin fand sich keine merkliche Abnahme der Spaltung (Tabelle II.). Durch diese Versuchsergebnissen in Tabelle II wurde klar, dass die Spaltbarkeit der einzelnen Substrate verschieden voneinander war, indem der β -Isomer die grösste, das Iso-octopin eine mittelgrosse und das Octopin die kleinste Spaltbarkeit aufweist.

Das Obige erklärt sich vielleicht daraus, dass das Verhalten eines Substrats gegen das Ferment durch Einführung einer Atomgruppe ins Substratmolekül in quantitativer Hinsicht in verschiedener Weise beeinflusst wird, je nachdem die Konfiguration sowie die Kupplungsweise derselben Atomgruppe verschieden sind.

Die Resultate der vorliegenden Untersuchungen könnten allenfalls einen experimentellen Beitrag zur Spezifitätsfrage der Arginase insofern liefern, als die benutzten Argininderivate, deren Carboxyl- und Guanidingruppe intakt und deren- α -Aminogruppe mit einer besonderen Atomgruppe bedeckt sind, durch Arginase gespalten werden.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Tierische Arginase verschiedener Herkunft (Hund, Kaninchen und Kalb) wurde nach S. Edlbacher u. H. Röthler (1925) hergestellt. Ganz frische Leber wurde mit der Hackmaschine zerkleinert und mit der 3 fachen Menge Glycerin unter häufigem Schütteln 36 Stunden extrahiert, dann durch eine mehrfache Lage von Mull koliert und der Extrakt auscentrifugiert. Dieser Glycerinextrakt wurde beim Versuch mit dem 2 fachen Volumen Wasser verdünnt, filtriert, und vom Filtrat wurden je 1 bis 6 ccm verwendet.

Als Substrat wurden Octopin, Iso-octopin und der β -Isomer und zum Kontrollversuch *d*-Argininmonochlorhydrat verwendet, von welchen Substanzen je eine gewisse Menge abewogen, in Wasser aufgelöst und unter Zusatz von Alkali zum gesuchten PH 9,5 gebracht und alles schliesslich mit Wasser so weit verdünnt wurde, dass die Stickstoffmenge pro 2,5 ccm der Lösung bei der Kjeldahlbestimmung 20,000 ccm $n/50\text{-H}_2\text{SO}_4$ verbrauchte. Zu je 2,5 ccm Substratlösung wurden 10 ccm Puffer PH=9,5 (Glycin-Natron), dann 1 bis 6 ccm Fermentlösung hinzugefügt und alles 3 Tage im Thermostaten bei 38° unter Toluol stehen gelassen. Darauf wurde das Ferment durch halbstündiges Erhitzen im siedenden Wasserbad inaktiviert. Zur Bestimmung des abgespaltenen Harnstoffs wurde das Gemisch mit $n/10\text{-HCl}$ auf PH=7,0 gebracht und dann alles bei 20° eine Stunde stehen gelassen. Das gebildete Ammoniak wurde bei sodaalkalischer Reaktion durch einstündiges Durchleiten des Luftstroms in die mit $n/50\text{-H}_2\text{SO}_4$ beschickten Vorlagen übergetrieben und mit $n/50\text{-NaOH}$ titrimetrisch bestimmt. Der Leerversuch wurde mit Wasser anstatt der Substratlösung, im übrigen aber unter den ganz gleichen Bedingungen wie oben angestellt und der gefundene Wert stets von dem des eigentlichen Versuchs abgezogen.

1. Bestimmung des pH-Optimums und der Wirkungszeit für die maximale Spaltung.

Ansatz:

Ferment: 6 ccm aufs 3 fache verdünnter Kaninchenleber-Glycerinextrakt.

Substrat: 2,5 ccm wässrige Substratlösung, deren Gesamtstickstoff nach Kjeldahlbestimmung 20,00 ccm $n/50\text{-H}_2\text{CO}_4$ verbraucht.

Puffer: 10 ccm Phosphat- oder Glycin-Natron-Lösung.

Die Spaltungen sind in Prozentzahlen unter Berücksichtigung des Kontrollwerts angegeben.

TABELLE I.

Octopin.				
Wirkungszeit (Stunde)	Abbau bei verschiedenen PH-Medien (%)			
	pH 6,5	pH 8,0	pH 9,5	pH 10,8
1½	0	0	0	0
5	0	8	35	31
24	0	22	60	57
48	0	35	78	59
72	0	39	86	60
96	—	—	88	—
Iso-octopin.				
72	0	25	98	67
β -Isomer.				
72	0	39	99	67

II. Spaltung der Substrate bei verschiedener Fermentmenge.

Sämtliche tabellarisch angegebene Resultate sind in den darauffolgenden Abbildungen in Kurvenform wiedergegeben.

TABELLE II. Versuch mit Kaninchenleber.

Substrat	Substratmenge (cem n/50- H ₂ SO ₄)	Fermentmenge (cem)	Harnstoffbildung	
			(cem n/50- H ₂ SO ₄)	% der Theorie
Arginin- monochlor- hydrat	20,00	6	9,95	99
		4	9,90	99
		2	9,45	94
		1	9,15	91
Octopin	20,00	6	8,75	87
		4	6,40	64
		2	3,20	32
		1	1,60	16
Iso-octopin	20,00	6	9,70	97
		4	8,75	87
		2	5,75	57
		1	3,35	33
β -Isomer	20,00	6	9,95	99
		4	9 85	98
		2	6,95	69
		1	4,90	49

TABELLE III. Versuch mit Hundeleber.

Substrat	Substratmenge (cem n/50- H ₂ SO ₄)	Fermentmenge (cem)	Harnstoffbildung	
			(cem n/50- H ₂ SO ₄)	% der Theorie
Arginin- monochlor- hydrat	20,00	6	9,90	99
		4	9,85	98
		2	9,85	98
		1	9,80	98
Octopin	20,00	6	6,10	61
		4	4,40	44
		2	1,50	15
		1	0,00	0
Iso-octopin	20,00	6	9,70	97
		4	7,20	72
		2	4,10	41
		1	0,95	9
β -Isomer	20,00	6	9,80	98
		4	9,70	97
		2	6,85	68
		1	2,35	23

TABELLE IV. Versuch mit Kalbsleber.

Substrat	Substratmenge (ccm n/50- H ₂ SO ₄)	Fermentmenge (ccm)	Harnstoffbildung	
			(ccm n/50- H ₂ SO ₄)	% der Theorie
Arginin- monochlor- hydrat	20,00	6	9,97	99
		4	9,95	99
		2	9,35	93
		1	9,15	91
Octopin	20,00	6	1,25	12
		4	0,55	5
		2	0,00	0
		1	0,00	0
Iso-octopin	20,00	6	2,85	28
		4	1,80	18
		2	0,00	0
		1	0,00	0
β -Isomer	20,00	6	9,70	97
		4	5,50	55
		2	0,95	9
		1	0,00	0

Abb. 1.

Versuch mit Kaninchenleber.

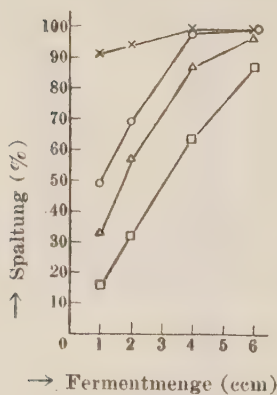
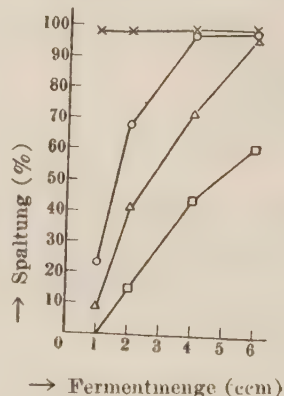


Abb. 2.

Versuch mit Hundeleber.



Octopin (-□-□-)

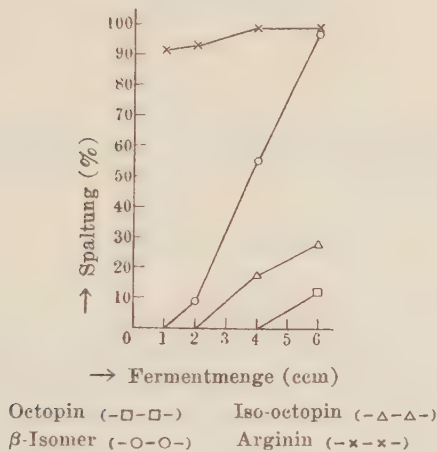
 β -Isomer (-○-○-)

Iso-octopin (-Δ-Δ-)

Arginin (-x-x-)

Abb. 3.

Versuch mit Kalbsleber.



LITERATURVERZEICHNIS.

- Thomas, K., Kapfhammer, J. u. Flaschenträger, B. (1922): Zeit. f. physiol. Chem., **124**, 75.
 Edlbacher, S. u. Bonem, P. (1925): Zeit. f. physiol. Chem., **145**, 69.
 Steib, H. (1926): Zeit. f. physiol. Chem., **155**, 279.
 Felix, K., Müller, H. u. Dirr, K. (1928): Zeit. f. physiol. Chem., **178**, 192.
 Kamiya, S. (1935): J. of Biochem., **22**, 263.
 Edlbacher, S. u. Röthler, H. (1925): Zeit. f. physiol. Chem., **148**, 264.
 Akasi, S. (1937): J. of Biochem., **25**, u. 26.

ÜBER HYDROLYSE DES α - UND β -GLYCEROPHOSPHATES.

VON

KIKUMA HASHIMOTO.

(Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Medizinischen Akademie zu Chiba. Direktor: Prof. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 16. März 1937)

Es bedarf kaum weiterer Erwähnung, dass α - und β -Glycerophosphat durch Phosphomonoesterase hydrolysiert wird. Meistens wurde beobachtet, dass β -Glycerophosphat stärker oder in gleichem Grade wie α -Glycerophosphat hydrolysierbar ist. Jedoch gibt es auch dagegensprechende Angaben, nämlich dass α -Glycerophosphat dem β -Glycerophosphat gegenüber stärker hydrolysiert werden kann. Roche (1931) berichtete, dass durch Erythrocytenphosphatase von Kaninchen und Hund α -Glycerophosphat einer schnelleren Hydrolyse als β -Glycerophosphat anheimfallen kann. Ausserdem wurde noch von Schöffner und Bauer die Existenz einer spezifischen α -Glycerophosphatase in der Hefe berichtet. Dieses Ferment vermag bloss auf α -Glycerophosphat spezifisch einzuwirken, aber auf β -Glycerophosphat fast keine hydrolytische Wirkung zu entfalten. In hiesigem Institut haben früher Asakawa (1930) und Kobayashi (1930) mittels der gereinigten Takaphosphatase die Hydrolyse von α - und β -Glycerophosphat in verschiedenem pH untersucht und dabei beobachtet, dass β -Glycerophosphat bei pH 3 stärker als α -Glycerophosphat hydrolysiert wird und bei verminderter Azidität die Hydrolyse des ersteren eine allmähliche Abnahme, während diejenige des letzteren eine Zunahme erfährt, und bei pH 5.6 eine fast gleichgradige Hydrolyse der beiden Isomeren gefunden wird. Dies weist darauf hin, dass sich α - und β -Glycerophosphat bei ihrer enzymatischen Hydrolyse gegen pH des Medium verschieden verhalten. Asakawa hat das Verhältnis der chemischen Natur der phosphoryerten OH-Gruppe

zugeschrieben. Aber die Nachprüfung von Manaka (1931) in unserem Institut hat zustimmende Resultate nicht ergeben, was wohl darauf zurückzuführen sein könnte, dass Takadiastase nicht immer dieselbe Zusammensetzung hat. Asakawa war dabei der Meinung, dass α - und β -Glycerophosphat durch dasselbe Ferment aufzuspalten sind, und er wollte das verschieden beobachtete Optimum damit erklären, dass die mit dem Ferment reagierende Ionisationsform des Substrats bei α - und β -Glycerophosphat verschieden ist.

Hotta (1934) hat früher das spezifische Verhalten der Phosphorsäureester von hydroaromatischen Alkoholen angegeben. Nach ihm sind solche Ester durch die Monoesterase III nicht spaltbar, wohl aber durch die I und II. Dabei blieb dahingestellt, ob die Hydrolyse solcher Ester in saurer Reaktion durch eine spezifische Phosphomonoesterase katalysiert wird, weil er nicht imstande war, eine Fermentlösung, die ausschliesslich die hydroaromatischen Ester aber nicht sonstige Phosphorsäuremonoester spalten kann, isoliert zu gewinnen. Die obenerwähnte Schöffnersche Angabe über die spezifische α -Glycerophosphatase ist noch weitgehender. Durch dieses Ferment wird das β -Glycerophosphat nicht hydrolysiert, das sonst immer ebenso gut wie das α -Salz aufzuspalten ist. Man kennt aber bisher keine Phosphomonoesterase, die im umgekehrten Sinne bloss das β -Glycerophosphat, aber nicht das α -Glycerophosphat hydrolysieren würde. Ich wollte dem merkwürdigen Verhalten des α -Glycerophosphats auf experimentellem Wege näher kommen.

Zuerst wurde die Hydrolyse des α - und β -Glycerophosphats durch die Phosphomonoesterase I, II, und III vergleichend untersucht. Als Monoesterase I und III diente das dialysierte Schweinenierenautolysat nach Asakawa, da die Lösung 2 Arten von Monoesterase enthält, deren optimales pH bei 3.2 und 9.0 liegt. Den nach Uza wa bereiteten dialysierten Reiskleienextrakt stellt die Monoesterase dar, die das Optimum bei pH 5.5 aufweist, und so habe ich es als Monoesterase Typus II verwendet.

Um das Verhältnis klar zu erkennen, wurde vorher bestimmt, wievielfach die originalen Fermentlösungen verdünnt werden

sollen, um β -Glycerophosphat in jedem optimalen PH zur gleichgradigen Hydrolyse zu bringen. Man liess die so verdünnten Fermentlösungen dann bei ihrem betreffenden PH auf α -Glycerophosphat einwirken, wobei durch Monoesterase Typus II und III α - und β -Glycerophosphat fast in gleichem Grade, aber durch Typus I β -Glycerophosphat viel leichter hydrolysiert wurden. Die schwache Hydrolyse des α -Glycerophosphats durch die Monoesterase I war auffallend, aber als die Hydrolyse des α -Glycerophosphates durch die Monoesterase Typus I in verschiedenem PH untersucht wurde, war das optimale PH (3.2) gleich dem des β -Glycerophosphats zu beobachten.

Dann wurde die Hydrolyse des Hexosediphosphats durch 3 Arten von Monoesterase untersucht. Auf die Kaliumsalzlösung, welche aus Candiolin hergestellt wurde, liess man die Fermentlösungen, welche derart verdünnt worden waren, dass sie, wie oben beschrieben, β -Glycerophosphat in gleichem Grade zu hydrolysieren vermögen, in jedem optimalen PH einwirken. Abgesehen von der verschiedenen Anfangsgeschwindigkeit der Dephosphorierung war es auffallend, dass die Hydrolyse bei Typ II und III mit der Zeit ansteigt und dagegen bei Typ I die Hydrolysegeschwindigkeit nach Überschreiten von 50%iger Spaltung beträchtlich absinkt. Diese Verzögerung kann nicht ohne weiteres erklärt werden, aber sie war so deutlich, dass ich das Spaltprodukt des Candiolins untersuchen wollte, das bei der Abspaltung der Hälfte von Total P entsteht. So habe ich auf eine grosse Menge gereinigten Calcium Hexosediphosphats die Monoesterase Typ I bei PH 3.2 einwirken lassen. Als nach 72 Stunden 49% Hydrolyse in Erscheinung trat, wurde die Lösung mittels Ammoniak schwach alkalisch gemacht und filtriert. Der aus dem Filtrat durch Zusatz von Bleiessig gebildete Niederschlag wurde gut gewaschen, in Wasser suspendiert und Schwefelwasserstoff darin eingeleitet, während dessen die Reaktion der Lösung durch Zusatz von Baryt gegen Kongorot neutral gehalten wurde. Dann wurde das Filtrat unter vermindertem Druck eingeeengt, mit Baryt gegen Phenolphthalein neutralisiert, das dabei niedergeschlagene anorganische Phosphat entfernt und dem Filtrat eine grosse Menge Alkohol zugesetzt. Der nach

24 Stunden langem Stehenlassen im Eisschrank gebildete Niederschlag wurde gesammelt und mit Alkohol-Äther behandelt. Das so gewonnene weissliche Pulver war frei von anorganischem P und sein Gehalt an gebundenem P betrug 7.77% und stimmte mit der theoretischen Zahl 7.8% gut überein, welche als Barium Hexosemonophosphat berechnet erhalten wurde. Aus 1.8 g Candiolin wurde 1.2 g Bariumsalz gewonnen. Die spezifische Drehung betrug $+1.5^\circ$. Das Salz war also hauptsächlich als Bariumsalz des Neubergesters zu betrachten.

Dieses Ba-Salz wurde in Lösung mittels Kaliumsulfat in Kaliumsalz übergeführt und darauf liess man Monoesteraselösung von Typ I, II und III, welche derart verdünnt worden waren, dass sie, wie obenbeschrieben, β -Glycerophosphat in gleichem Grade zu hydrolysieren vermochten, einwirken. So konnten Monoesterasen von Typ II und III in 2 Stunden in 20.4% resp. 38.9% Hydrolyse hervorrufen, während die Hydrolyse bei Typ I in derselben Zeit in viel geringerem Grade und zwar nur 13.4% erfolgte. Die Hydrolysierbarkeit des Hexosemonophosphats durch 3 Arten Monoesterase war zufällig in derselben Reihe wie die des α -Glycerophosphats. Das aus Candiolin chemisch durch partielle Hydrolyse dargestellte Neubergester verhielt sich gegen 3 Typen Monoesterase in gleicher Weise wie das enzymatisch breitete Hexosemonophosphat. Dies spricht wohl dafür, dass der Typ I Phosphomonoesterase aus Hexosediphosphorsäureester zuerst hauptsächlich das Neubergester bildet, welches dann allmählich in Zucker und Phosphorsäure hydrolysiert wird. Bei der Phosphomonoesterase von Typ II und III ist die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, dass zugleich Neubergester und anderes Zucker-Monophosphorsäureester gebildet werden. Die das β -Glycerophosphat gleichgradig spaltenden Fermentlösungen wurden weiter auf die Diphosphoglycerinsäure untersucht. Hier war die Hydrolysierbarkeit in der Reihe wie $II > III > I$. Ich habe ausserdem beobachtet, dass das Propylphosphat in derselben Versuchsanordnung in gleichem Grad gespalten wird und dass das Isopropylphosphat durch I und II Monoesterase in gleichem Grad, aber durch das III Ferment, wie von Hotta beobachtet, fast gar nicht hydrolysiert wird. Man

sieht also, dass unter Umständen je nach der chemischen Natur des phosphorierten Alkohols ein qualitativer Unterschied der Hydrolysierbarkeit vorkommen kann, aber auch, dass die quantitativ verschieden ermittelte Hydrolysierbarkeit bei einer bestimmten Azidität nicht ohne weiters mit der chemischen Natur der veresterten OH-Gruppe zusammenhängt.

Die Wirkung der Erythrocytenphosphatase auf α - und β -Glycerophosphat wurde dann untersucht.

Die Erythrocyten des defibrinierten Kaninchenbluts wurden mit physiologischer Kochsalzlösung gut gewaschen und unter Zusatz gleichen Volumens Wasser hämolysiert. Mit dieser Probe konnte ich nachweisen, dass α -Glycerophosphat schneller als β -Glycerophosphat der Hydrolyse anheimfallen kann. Auch mit den in gleicher Weise hergestellten Erythrocyten von Kuh, Pferd, Hund, Katze, Ziege, Schaf und Schwein wurde eine bessere Hydrolyse des α -Glycerophosphats festgestellt. Ein Befund von gleichem Sinne wurde auch bei dem Versuch mit der gegen Wasser 1 Tag dialysierten Erythrocytenlösung von verschiedenen Tieren erworben. Damit wurde an der Blutphosphatase die leichtere Dephosphorierbarkeit des α -Glycerophosphats gegenüber dem β -Isomer bestätigt.

Als ich aber an den dialysierten Kaninchenerythrocytenlösungen die individuelle Schwankung des Phosphatasegehalts untersuchen wollte, kam es bei einigen Fällen vor, dass α - und β -Glycerophosphat in gleichem Grad aufgespalten wurden oder sogar die β -Form leichter der Hydrolyse anheimfiel. Diese scheinbare Verwirrung konnte durch weitere Untersuchung aufgeklärt werden. Es handelte sich darum, dass die Erythrocytenphosphatase selbst bei Aufbewahrung im Eisschrank mit der Zeit ihre überwiegende Wirkung auf α -Glycerophosphat einbüsst. Die Verminderung der Spaltbarkeit des α -Glycerophosphats hängt daher auch von der Dialysendauer ab. Beim mehrtägigen Dialysieren kann die α -Glycerophosphatspaltung unter die des β -Salzes herabgesetzt werden. Diese Herabsetzung ist aber bei der Dialyse gegen 1% (KCl) statt gegen Wasser so vorzubeugen, dass selbst nach 6 tägiger Dialyse die Lösung auch noch α -Glycerophosphat leichter als das

β -Salz aufzuspalten imstande war.

Hori (1932) hat beobachtet, dass die Erythrocyten eine kräftige Monoesterase I ausser der Esterase II enthalten. Nach ihm war aber die Wirkung des ersten Ferments in der einfachen Blutlösung nicht zu konstatieren, weil bei mehr saurer Reaktion als $\text{pH } 5$ in der Versuchslösung eine reichliche Niederschlagbildung stattfand, die selbstverständlich auf die Fermentaktivität einen schädlichen Einfluss ausübt. Jene Niederschlagbildung war aber bei der Blutlösung, die mit dem Schlangen-Gift hämolysiert bereitet war, nicht zu beobachten und der Versuch mit solcher Lösung ergab deutlich die Existenz der Monoesterase I. Ich habe es bestätigt gefunden und weiter beobachtet, dass β -Glycerophosphat bei $\text{pH } 3.4$ weit besser als das α -Salz hydrolysierbar ist, während bei $\text{pH } 6.2$ die Hydrolysierbarkeit der beiden Isomeren beinahe gleich kommt. Durch die Behandlung mit dem Schlangengift verschwindet also die überwiegende α -Abbaufähigkeit der Blutlösung.

Durch die oben erwähnten Versuche kann man aus Kaninchenblut je nach dem Verfahren bald eine Phosphataselösung, die das α -Glycerophosphat leichter als das β -Salz angreift, und bald eine andere Lösung, die beide Isomere fast in gleichem Grad spaltet, herstellen. Dies wurde weiter dadurch bestätigt, dass solche Fermentlösungen aus demselben Kaninchenblut bereitet werden. Einem Kaninchen wurde Blut entnommen, welches teils defibriniert und teils durch Zusatz von Oxalat gerinnungsunfähig gemacht wurde. Das defibrinierte Blut wurde in 4 Proben geteilt. Die erste Probe wurde mit 10 fachem Volumen Wasser hämolysiert und sogleich zum Versuch gebraucht: $\alpha > \beta$. Die zweite Probe wurde zentrifugiert und die mit Kochsalzlösung gewaschenen Erythrocyten wurden mit 10 fachem Volumen Wasser gelöst und ohne Dialyse zum Versuch angewandt: $\alpha > \beta$. Die Erythrocyten aus der dritten Probe wurden dann mit gleichem Volumen Wasser aufgelöst und bei 15°C gegen Wasser übernacht dialysiert. Der Versuch mit dem Dialysat ergab: $\alpha > \beta$. Als dieses Dialysat noch 2 Tage im Eisschrank stehen gelassen und weiter 3 Tage gegen Wasser dialysiert wurde, war eine gleichgradige Spaltbarkeit des

α - und β -Glycerophosphats zu beobachten. Die aus dem Oxalatblut hergestellte Erythrocytenlösung verhielt sich in derselben Weise. Die Erythrocyten aus der vierten Probe wurden mit gleichem Volumen 0.85% NaCl-Lösung, die ein Körnchen Habugift gelöst enthielt, versetzt und hämolysiert. Nach 12 stündiger Dialyse wurde der Versuch angestellt: $\alpha = \beta$. Der Versuch wurde am zweiten Kaninchen wiederholt und das Ergebnis war gleich. Aus den obenerwähnten Ergebnissen geht hervor, dass die Substanz, welche an der überwiegenden Spaltung des α -Glycerophosphats teilnimmt, von labiler Natur ist.

Um die Abhängigkeit dieser Labilität von der Wasserstoffzahl zu untersuchen, wurden die Erythrocyten durch Zusatz von gleichem Volumen Wasser hämolysiert, bei niedriger Temperatur übernacht dialysiert und bei verschiedener Azidität, nämlich von pH 3 bis pH 7, eine Stunde lang im Thermostat bei 37°C stehen gelassen. Darauf wurde pH an jeder Fermentlösung auf pH 6 korrigiert und jede Lösung wurde mit der Substratlösung versetzt, weiter zwei Stunden lang bei 37°C stehen gelassen. Nach dem Hydrolysegrad des β -Glycerophosphats beurteilt, war die Erythrocytenmonoesterase bei pH 6.0 am widerstandsfähigsten. Der die α -Glycerophosphathydrolyse begünstigende Faktor verhielt sich in gleicher Weise, aber er war noch empfindlicher gegen die starke saure Reaktion, daher war nach 1 stündigem Halten bei pH 3–4 die Fermentlösung nicht mehr in stande, bei pH 6 α -Glycerophosphat leichter als β -Salz aufzuspalten.

Der betreffende Faktor ist wasserlöslich und kann nach Acetonfällung wieder in Lösung gebracht werden, wie es die folgenden Versuche ergaben. Die einen Tag dialysierte Erythrocytenlösung wurde von dem während der Dialyse entstandenen Niederschlag durch Zentrifugieren getrennt und zum Versuch gebraucht. Wie bei der nicht zentrifugierten Lösung war die Hydrolyse des α -Glycerophosphats grösser als die des β -Salzes. Dagegen bewirkte der abgeschleuderte Bodensatz eine gleichgradige Spaltung der beiden Substrate. Die dialysierte Erythrocytenlösung wurde andererseits mit Aceton versetzt und der Niederschlag durch Aceton-Äther Behandlung in Pulver überführt. Als das Pulver mit Was-

ser digeriert und die überstehende Flüssigkeit zum Versuch angewandt wurde, war die Hydrolyse des α -Glycerophosphats grösser als die des β -Salzes, während der abgeschleuderte Bodensatz eine gleichgradige Hydrolyse zeigte.

Als nächstes möchte ich die Versuche an Hand der Hefephosphatase erwähnen. Das Ferment wurde aus Trockenhefe genau nach der Vorschrift von Schöffner und Bauer (1934, 1935) bereitet und gegen 50% Glycerin dialysiert. Der Versuch mit dieser Fermentlösung ergab, dass es keine spezifische α -Glycerophosphatase darin gibt, weil das β -Glycerophosphat dadurch, obwohl in etwas geringerem Grad als das α -Salz, doch wohl hydrolysiert wurde. Kobayashi (1936) konnte kürzlich die saure und alkalische Phosphomonoesterase getrennt aus Trockenhefe extrahieren. Die erstere ist die Monoesterase I, die bei P_H 3.2 optimal wirkt. Bei P_H 3 geprüft, war die Hydrolyse des α -Glycerophats geringer als die des β -Salzes. Die letztere Monoesterase III, die optimal bei P_H 8-9 wirkt, spaltet die beiden Substrate bei P_H 6.4 fast in gleichem Grade, aber bei ihrer optimalen Azidität, nämlich P_H 8.4, war die Hydrolyse des β -Salzes weit grösser. Diese Versuche mit den Kobayashis Fermentlösungen zeigen vielleicht bloss, dass der an der überwiegenden α -Glycerophosphathydrolyse teilnehmende Faktor von vornherein in der Trockenhefe verarmt war oder während des Extraktionsverfahrens zerstört wurde, und aber auch, dass wo das β -Glycerophosphat hydrolysierbar war, die Spaltung des α -Salzes immer zugleich beobachtet wurde.

Kobayashi hat bei dem Versuch über Carboxylase „Ebios“, ein Hefepräparat im Handel, gebraucht, weil daraus die Extraktion dieses Ferments leicht vonstatten ging. Ich extrahierte diese Trockenhefe mit Wasser und dialysierte den Extrakt im Eisschrank gegen Wasser 7 Stunden unter 4 maliger Wechselung des Wassers. Mit diesem Dialysat konnte ich starke Spaltung des α -Glycerophosphats beobachten, aber auch die des β -Salzes, obwohl bei ganzem P_H-Bereich in weit schwächerem Grade.

Ich habe oben erwähnt, dass die 3 Typen Monoesterase, die je bei ihrem optimalen P_H das β -Glycerophosphat in gleichem Grad hydrolysieren, auf das α -Glycerophosphat und das Hexosemono-

phosphat in solcher Reihe wie $\text{III} > \text{II} > \text{I}$ wirksam waren. Aber mit der Ebiosphosphatase war die Hydrolysierbarkeit des Hexosemonophosphats fast gleich wie die des β -Glycerophosphats und daher geringer als die des α -Glycerophosphats. Dieses Resultat zeigt, dass der die stärkere Hydrolyse des α -Glycerophosphats verursachende Faktor mit der Hydrolyse des Hexosemonophosphats nichts zu tun hat.

Was der Faktor ist, ist schwer zu ersehen. Schöffner hat ihn als eine spezifische α -Glycerophosphatase angegeben. Die gelungene Isolierung der " α -Glycerophosphatase" ist an sich bemerkenswerter als die oben erwähnten Befunde, dass α - und β -Glycerophosphate in allen Fällen zugleich angegriffen wurden. Aber angesichts der einfachen Konstitution der Substrate und ausserdem darauf achtend, dass keine Fermentlösung bekannt ist, die wohl auf β -Glycerophosphat aber nicht auf das α -Salz wirksam wäre, muss das Wesen der Spezifität der " α -Glycerophosphatase" noch weiter erforscht werden. α -Glycerophosphat ist bekanntlich ein wichtiges intermediäres Produkt des biologischen Zuckerabbaus und reagiert, ohne vorher durch die in dem System reichlich vorhandene Phosphatase aufgespalten zu werden, mit Brenztraubensäure oder Acetaldehyd, um sich in Triosephosphat zu verwandeln.

Ich habe daher eine Arbeitshypothese aufgestellt: Phosphomonoesterase spaltet überhaupt α - und β -Glycerophosphat in gleichem Grad oder das letztere etwas besser, aber vorausgesetzt, dass in dem System ein anderes Ferment vorhanden ist, durch dessen Wirkung das α -Glycerophosphat spezifisch eine chemische Veränderung erfährt, und das entstandene Reaktionsprodukt spontan oder enzymatisch leichter als das Glycerophosphat dephosphorierbar ist, so kann die schnellere und im extremen Fall die ausschliessliche Dephosphorierung des α -Glycerophosphats vorkommen. Diese Ideenauffassung wurde besonders dadurch angeregt, dass die auswählende starke Dephosphorierung des α -Glycerophosphats bisher nur bei dem Extrakt der Trockenhefe, die Zymasekomplex reichlich enthält, verwirklicht wurde, oder bei der nicht zu lange dialysierten Erythrocytenlösung, die einen relativ

kleinen Phosphatasegehalt aufweist, aber doch aus dem Hexosediphosphat eine in stark saurer Reaktion mittels Dinitrophenylhydrazins fällbare Substanz, Methylglyoxal oder Brenztraubensäure, zu liefern imstande ist. Es ist noch zu erwähnen, dass das α -Glycerophosphat enzymatisch dehydrierbar ist, dagegen das β -Salz der Dehydrasewirkung widersteht.

Um diese Arbeitshypothese experimentell weiter zu entwickeln, müssen Versuche angestellt werden, die beweisen würden, dass die nicht zu lang dialysierte Erythrocytenlösung bei künstlichem Zusatz von einer dritten Substanz weitere Förderung der überwiegenden α -Glycerophosphatspaltung erfährt oder die Erythrocytenlösung, die nach langedauernder Dialyse die α - und β -Substrate nur in gleichem Grade zu spalten imstande ist, durch den künstlichen Zusatz wieder zur überragenden Dephosphorierung des α -Substrats gebracht wird. Die Versuche verliefen leider alle negativ.

Ich habe $MgCl_2$, $NiSO_4$, $FeSO_4$, oder Natrium Pyruvinat in M/1,000 Endkonzentration zugesetzt, aber das Verhältniss des Hydrolysegrads $\alpha : \beta$ wurde dadurch nicht verändert. Methylenblau, Glutathion oder Ascorbinsäure übte keine Veränderung des Verhältnisses. Eiskalt zermahlene Herz- oder Skelettmuskel des Kaninchens, welche beide Glycerophosphatdehydrase enthalten, wurde zusammen mit dialysierter Erythrocytenlösung, bald in Vacuum unter Methylenblauzusatz, bald unter O_2 Durchleitung, auf Dephosphorierung des α - und β -Substrats geprüft, ohne merklichen Unterschied dabei gegen die Kontrollversuche zu beobachten. Die Leberalkoholdehydrase von Reichel und Köhle (1935) war auch dafür unwirksam. Glycerophosphatdehydrase wirkt eigentlich bei PH 9 optimal, daher mag ihre Wirkung bei den oben erwähnten Versuchen bei PH 6 nicht stark genug gewesen sein, um eine leicht dephosphorierbare Substanz zu liefern. Aber bei den Versuchen, wo bei PH 9 statt der Erythrocytenphosphatase das dialysierte Nierenautolysat gebraucht wurde, war das Resultat dasselbe, wie auf das α - und β -Glycerophosphat bei derselben Azidität, bloss dass Nierenferment einwirkte. Die letzten Jahres von Green (1936) miltgeteilte α -Glycerophosphatdehydrase wurde

auch geprüft. Dieses Präparat war auch nicht imstande, mit der Erythrocytenphosphatase zusammen eine geförderte Dephosphorierung des α -Substrats zu verursachen. Die zukünftigen Versuche sollen also darauf gerichtet werden, eine kräftige " α -Glycerophosphatase" zu isolieren und die Chemische Reaktion bei der Dephosphorierung analytisch zu studieren.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Darstellung der Substrate.

1. *Calcium Hexosediphosphat.*

Candiolin wurde nach Neuberg und Sebastian gereinigt.

Analyse: $C_6H_{10}O_4(PO_4Ca)_2$.

Gesamt-P.	berechnet	14.9%
	gefunden	14.86%

2. *α -Glycerophosphat.*

Glycid wurde nach Zetzche und Aeschlimann (1926) mit Phosphorsäure kondensiert und die entstandene α -Glycerophosphorsäure in Bariumsalz geführt.

Analyse: $C_3H_7O_6P$ Ba.

Gesamt-P.	berechnet	10.02%
	gefunden	10.00%

3. *β -Glycerophosphat.*

Natriumglycerophosphat "Merek" wurde umkrystallisiert. Es enthielt 5 Molekül Krystallwasser.

Calcium- und Bariumsalz des Substrats wurde beim Versuch vorher in Kaliumsalz übergeführt.

Herstellung der Fermentlösungen.

1. Das dialysierte Nierenferment nach Asakawa (1928).
2. Das Reiskleienferment, Monoesterase II, wurde nach Uzawa hergestellt, aber ohne Reinigung durch die Adsorptionsmethode.
3. Hefephosphatase nach Schöffner (1935).
4. Die saure und alkalische Hefephosphatase nach Kobayashi (1936).

5. Ebiosphosphatase.

Ebios wurde mit 10 fachem Volumen Wasser im Eisschrank übernacht extrahiert, nach Zentrifugieren wurde die überstehende Lösung im Eisschrank unter 4 maligem Wechseln des Wassers 7 Stunden lang dialysiert.

6. Erythrocytenphosphatase.

Durch Herzpunktion entnommenes Blut wurde sogleich mit Glasstäbchen defibriniert und langsam zentrifugiert, die abgehobene Erythrocytenschicht wurden mit 0.85% NaCl-Lösung gut gewaschen.

Weitere Verarbeitung wird unten einzeln angegeben.

Puffer Lösung.

1. Acetat-Essigsäure.

2. Glykokoll-HCl und Glykokoll-Natron.

3. Veronal-Acetat-HCl nach Michaelis.

Ph der Versuchslösungen wurde elektrometrisch oder mittels Indikators bestimmt. Phosphor Bestimmung nach Fiske und Subbarow. Die gemessene anorganische Phosphorsäure wurde in den nach folgenden Protokollen überall, für 1 ccm Versuchslösung berechnet, als P in mg angegeben.

Versuch I.

Aktivität der dialysierten Fermentlösungen war an sich nicht gleich. Die Wirkung der Nierenfermentlösung bei PH 3 (I Monoesterase) war beträchtlich schwächer als dieselbe bei PH 9. (III Monoesterase). Um gleichgradige Hydrolyse des β -Glycerophosphats zu erzielen, muss die Fermentlösung bei dem Versuch bei PH 9 verdünnt werden. Nach der zeitlichen Hydrolysenkurve beurteilt, konnte nach mehrmaliger Prüfung die zu gebrauchenden Fermentmenge ermittelt werden. Der dialysierte Reiskleienauszug wurde in gleicher Weise zweckmässig verdünnt. 2 stündige Hydrolyse des α - und β -Glycerophosphats wurde mit solchen Fermentlösungen ausgeführt.

M/100 Substrat- lösung	10.0 ccm	M/100 Substrat- lösung	10.0 ccm	M/100 Substrat- lösung	10.0 ccm
Puffer	10.0 ccm	Puffer	10.0 ccm	Puffer	10.0 ccm
Nierenferment (unverdünnt.)	20.0 ccm	Reiskleienferment (4 fach verdünnt.)	6.0 ccm	Nierenferment (unverdünnt.)	2.0 ccm
		Wasser	14.0 ccm	Wasser	18.0 ccm

Versuchsdauer 2 Stunden bei 37°C.

Fermentarten	PH	α -Glycerophosphat		β -Glycerophosphat	
		P-mg	%	P-mg	%
Nierenferment	3.0	0.0123	15.9	0.025	32.3
Reiskleienferment	5.6	0.0217	28.0	0.0245	32.2
Nierenferment	9.0	0.0289	37.4	0.0251	32.4

Versuch II.

Vergleichende Hydrolyse des Hexosediphosphats durch Nieren- und Reiskleienferment. Gleichgradige Spaltung der β -Glycerophosphats wurde wie folgt vorher geprüft.

PH 3.0		PH 5.6		PH 9.0	
M/100 β -Glycero- phosphat	10.0 ccm	M/100 β -Glycero- phosphat	10.0 ccm	M/100 β -Glycero- phosphat	10.0 ccm
Puffer	10.0 ccm	Puffer	10.0 ccm	Puffer	10.0 ccm
Nierenferment	20.0 ccm	Reiskleienferment (4 fach verdünnt.)	6.0 ccm	Nierenferment	2.0 ccm
		Wasser	14.0 ccm	Wasser	18.0 ccm

	PH 3.0		PH 5.6		PH 9.0	
	P-mg	%	P-mg	%	P-mg	%
1 St.	0.0148	19.15	0.0164	21.16	0.0156	20.24
2 St.	0.0247	31.43	0.0256	32.94	0.0253	32.6

Der Versuch mit Hexosediphosphat wurde in gleicher Zusammensetzung der Versuchslösung ausgeführt.

St.	Nierenferment (I)		Reiskleienferment		Nierenferment (III)	
	P-mg	%	P-mg	%	P-mg	%
2	0.0638	41.2	0.0331	21.4	0.0645	41.4
4	0.0784	50.6	0.0488	31.5	0.0976	62.8
24	0.1032	66.6	0.0966	61.0	0.1333	86.0
48	0.1288	83.1	0.1339	86.4	0.1596	101.7
72	0.1475	95.1	0.1596	101.7		

Versuch III A.

Vergleichende Hydrolyse des Hexosemonophosphats, das wie oben angegeben enzymatisch aus dem gereinigten Candiolin hergestellt wurde, ergab das folgende Resultat. Die gebrauchten Fermentlösungen und die Versuchsanordnung waren gleich denen im vorigen Versuch.

St.	Nierenferment (I)		Reiskleienferment		Nierenferment (III)	
	P-mg	%	P-mg	%	P-mg	%
2	0.0104	13.4	0.0158	20.3	0.0303	38.9
4	0.0157	20.3	0.0207	26.6	0.0457	58.9
24	0.0307	39.6	0.0438	56.5	0.0596	76.7
48	0.0459	57.8	0.0585	75.4	0.0651	84.0

Versuch III B.

Hexosemonophosphat, das nach Neuberg (1918) chemisch aus Candiolin durch partielle Hydrolyse mittels Oxalsäure hergestellt wurde, wurde nachher bei anderer Gelegenheit zur vergleichenden Hydrolyse gebraucht. Das Experiment verlief in gleichem Sinne wie beim Versuch IIIA.

St.	PH 3.2		PH 5.6		PH 9.0	
	Nierenphos (I)		Reiskleien Phos.		Nierenphos. (III)	
	P-mg	%	P-mg	%	P-mg	%
2	0.0129	16.6	0.0213	27.5	0.0509	65.1
4	0.0173	22.4	0.0289	37.3	0.0555	74.4
24	0.0317	40.9	0.0464	62.2	0.0680	87.8

Versuch IV.

Vergleichende Hydrolyse des Diphosphoglycerats, das nach Jost (1927) aus Pferdeerythrocyten bereitet war, wurde in gleicher Weise untersucht. Barium Diphosphoglycerat wurde im Versuch vorher in Kalium-Salz überführt. Vor dem Versuch mussten die neu hergestellten Fermentlösungen auf die gleichgradige Hydrolyse des β -Glycerophosphats geprüft werden.

<i>M</i> /100 β -Glycero- phosphat	5.0 ccm	<i>M</i> /100 β -Glycero- phosphat	5.0 ccm	<i>M</i> /100 β -Glycero- phosphat	5.0 ccm
Puffer	5.0 ccm	Puffer	5.0 ccm	Puffer	5.0 ccm
Nierenferment	4.0 ccm	Reiskleienferment (4 fach verdünnt)	4.0 ccm	Nierengerment (4 fach verdünnt)	3.0 ccm
Wasser	6.0 ccm	Wasser	6.0 ccm	Wasser	7.0 ccm

Versuchsdauer: 2 Studen bei 37°C.

PH 3.1		PH 5.5		PH 8.9	
P-mg	%	P-mg	%	P-mg	%
0.02	25.9	0.02	25.9	0.0194	25.1

Bei dem Versuch mit Diphosphoglycerat war die Zusammensetzung der Versuchslösungen wie oben angegeben.

Stde	PH 3.1		PH 5.5		PH 8.9	
	P-mg	%	P-mg	%	P-mg	%
1	0.0088	6.07	0.0121	8.3	0.0096	6.6
2	0.0126	8.7	0.0208	14.3	0.0144	9.9
20	0.0371	25.6	0.06	41.4	0.048	33.1
42	0.054	34.6	0.086	55.4	0.0705	45.4
60	0.0606	39.8	0.0912	58.9	0.075	48.4
98	0.069	45.5	0.099	63.95	0.0766	49.4

Versuch V.

Spaltung des Propyl- und Isopropylphosphats durch die gleich stark wirksamen Phosphatasen wurde in derselben Weise

vergleichend untersucht. Die gebrauchten Fermentlösungen waren dieselben wie bei dem Versuch IV. Versuchsdauer 2 Stunden.

	Nierenferment		Reiskleienferment		Nierenferment	
	PH 3.0		PH 5.6		PH 9.0	
	P-mg	%	P-mg	%	P-mg	%
Propylphosphat	0.016	20.6	0.0185	23.9	0.0141	18.2
Isopropylphosphat	0.013	16.8	0.0142	18.3	spur	0

Versuch VI.

Hefephosphatase von Schöffner wurde auf α - und β -Glycerophosphat bei Ph 6.0 einwirken gelassen. Dieselben Versuche wurden mit den zwei anderen, im gleicher Weise hergestellten Fermentlösungen wiederholt. Versuchsdauer 2 Stunden.

M/100 Substrat	5.0 ccm
Puffer	5.0 ccm
Ferment	5.0 ccm
Wasser	5.0 ccm

Nr.	α -Glycerophosphat		β -Glycerophosphat	
	P-mg	%	P-mg	%
1	0.0156	20.1	0.0142	18.2
2	0.0198	25.5	0.016	20.6
3	0.0067	10.9	0.0058	9.4

Versuch VII.

Die Wirkung der sauren (I) und alkalischen (III) Hefephosphomonoesterase wurde auf α - und β -Glycerophosphat in folgender Weise geprüft.

M/100 Substrat	5.0 ccm
Puffer	5.0 ccm
Ferment	5.0 ccm
Wasser	5.0 ccm

	Ph	St.	α -Glycerophosphat		β -Glycerophosphat	
			P-mg	%	P-mg	%
Hefemono- esterase (I)	2.8	2	0.0052	6.7	0.0086	11.2
Hefemono- esterase (III)	6.4	2	0.0088	11.4	0.008	10.2
	6.4	4	0.0155	20.0	0.0149	19.3
	8.2	2	0.0162	22.4	0.0207	26.8
	8.2	4	0.0223	28.8	0.0278	35.8

Versuch VIII.

Phosphatatische Spaltung des α - und β -Glycerophosphats durch Erythrocytenlösung von verschiedenen Tierarten wurde bei Ph 6.0 in folgender Weise untersucht. Versuchsdauer 2 Stunden.

M/100 Substrat	5.0 ccm
Puffer	5.0 ccm
Ferment	5.0 ccm
Wasser	5.0 ccm

A. Erythrocytenphosphatase, die nicht dialysiert wurde.

Tierarten	α -Glycerophosphat		β -Glycerophosphat	
	P-mg	%	P-mg	%
Kaninchen 1.	0.0207	26.7	0.0147	19.0
" 2.	0.0311	40.0	0.0265	32.9
Ziege	0.016	20.6	0.0069	8.95
Schaf	0.0101	13.0	0.0052	6.7
Schwein	0.0108	14.0	0.006	7.7
Kuh	0.0133	19.8	0.0089	11.4
Hund	0.0248	32.0	0.0141	18.2
Katze	0.0264	34.0	0.016	20.6
Pferd	0.0241	31.0	0.0108	13.9

B. Dialysierte Erythrocytenphosphatase.

Tierarten	α -Glycerophosphat		β -Glycerophosphat	
	P-mg	%	P-mg	%
Ziege	0.0057	7.3	0.0019	2.4
Schaf	0.0048	6.2	0.002	2.5
Hund	0.0161	21.1	0.008	10.3
Katze	0.008	10.3	0.0044	5.7
Pferd	0.016	20.6	0.007	9.1

Versuch IX.

2 stündige α - und β -Glycerophosphathydrolyse durch dialysierte Kaninchenerythrocytenphosphatase bei $\text{PH } 6.0$.

$M/100$ Substrat	3.0 ccm
Puffer	6.0 ccm
Ferment	3.0 ccm
Wasser	3.0 ccm

Nr.	α -Glycerophosphat		β -Glycerophosphat		Anmerkung
	P-mg	%	P-mg	%	Dialysedauer
1	0.0140	22.5	0.007	11.2	1 Tag gegen Wasser
2	0.0218	35.1	0.0136	21.9	1 Tag gegen Wasser
3	0.0141	22.7	0.0092	14.8	2 Tage gegen Wasser
4	0.0108	17.4	0.0136	21.9	4 Tage gegen Wasser
5	0.0124	20.0	0.0078	12.7	6 Tage gegen 1% KCl
6	0.0204	33.0	0.0074	11.9	6 Tage gegen 1% KCl
7	0.0132	21.4	0.006	9.7	6 Tage gegen 1% KCl

Versuch X.

α - und β -Glycerophosphathydrolyse durch die mit Habugift hämolysierten Kaninchenerythrocyten. Versuchsdauer 3 Stunden.

$M/100$ Substrat	5.0 ccm
Puffer	5.0 ccm
Ferment	5.0 ccm
Wasser	5.0 ccm

PH	α -Glycerophosphat		β -Glycerophosphat		Anmerkung
	P-mg	%	P-mg	%	
3.4	0.0241	31.7	0.044	56.7	nicht dialysiert
3.4	0.0254	32.3	0.0358	46.2	dialysiert
6.2	0.0292	37.7	0.0258	33.3	nicht dialysiert
6.2	0.024	31.0	0.0256	33.1	dialysiert

Versuch XI_A.

Hydrolyse des α - und β -Glycerophosphats durch Kaninchen-

blut oder Erythrocyten, die demselben Tier entnommen aber verschieden behandelt wurden. Bei diesem Versuch wurde immer gegen Wasser dialysiert. Hydrolyse bei $\text{pH } 5.8$ Versuchsdauer 2 Stunden. Beim Versuch mit der nicht dialysierten Probe wurde der Kontrollversuch angestellt, um damit den Hauptversuch zu korrigieren.

α -Glycerophosphat		β -Glycerophosphat		Vorbehandlung.
P-mg	%	P-mg	%	
0.0075	12.1	0.0051	8.2	Defibriniertes Blut, mit 10 fachem Volumen Wasser hämolysiert.
0.0132	21.2	0.0094	15.2	Erythrocyten aus demselben Blut, mit 10 fachem Volumen Wasser hämolysiert.
0.0151	24.4	0.0071	11.5	Dieselbe Erythrocytenlösung, 1 Tag dialysiert.
0.008	12.9	0.0076	12.3	Dieselbe Lösung, noch weiter 3 Tage dialysiert.
0.0124	19.7	0.0094	15.2	Erythrocyten aus Oxalatblut, mit 10 fachem Volumen Wasser hämolysiert und 1 Tag dialysiert.
0.007	11.4	0.0065	10.5	Dieselbe Lösung, noch weiter 3 Tage dialysiert.
0.0072	11.7	0.0086	13.9	Die durch Habugift aufgelösten Erythrocyten, 1 Tag dialysiert.

Versuch XI B.

Derselbe Versuch mit Blut eines anderen Kaninchens.

α -Glycerophosphat		β -Glycerophosphat		Vorbehandlung.
P-mg	%	P-mg	%	
0.0192	30.9	0.0147	23.8	Erythrocyten aus defibriniertem Blut, mit 10 fachem Volumen Wasser hämolysiert und 1 Tag dialysiert.
0.0129	20.8	0.0125	20.2	Dieselbe Lösung, noch weiter 3 Tage dialysiert.
0.0169	27.3	0.0148	23.9	Erythrocyten aus Oxalatblut, mit 10 fachem Volumen Wasser hämolysiert und 1 Tag dialysiert.
0.0111	17.9	0.0124	19.7	Dieselbe Lösung, noch weiter 3 Tage dialysiert.
0.012 6	20.3	0.0141	22.8	Die durch Habugift aufgelösten Erythrocyten, 1 Tag dialysiert.

Versuch XII.

Haltbarkeit der Kaninchenerythrocytenphosphatase wurde wie folgt untersucht. 3 ccm von einem Tag dialysierter Erythrocytenlösung wurde bei 37°C mit 5 ccm Puffer von verschiedenem PH eine Stunde aufbewahrt und darin durch Zusatz von berechneter Menge (a ccm) von Alkali oder Säure auf PH 6 neutralisiert, weiter mit 3 ccm *M*/100 Substratlösung und 4-a ccm Wasser versetzt. Das Volumen machte also 15 ccm. Hydrolyse des α - und β -Glycerophosphats wurde damit noch 2 Stunden verglichen. Kontrollerversuch wurde ohne weiters bei PH 6 mit 3 ccm Fermentlösung, 5 ccm Puffer, 3 ccm *M*/100 Substratlösung und 4 ccm Wasser angestellt.

Halten bei PH	Hydrolyse bei PH	α -Glycerophosphat		β -Glycerophosphat	
		P-mg	%	P-mg	%
2.9	6.0	0.008	12.9	0.0093	15.0
4.0	6.0	0.0084	13.6	0.011	17.7
4.9	6.0	0.0166	26.7	0.0155	24.0
5.9	6.0	0.0188	30.0	0.0158	25.6
7.0	6.0	0.016	25.8	0.0148	23.8
Kontrolle	6.0	0.0199	31.8	0.016	25.8

Versuch XIII.

Bei diesem Versuch wurde die 2 Tage dialysierte Kaninchenerythrocytenlösung in 2 Portionen geteilt. Die Hälfte diente sogleich zum Versuch. Die andere Hälfte (20 ccm) wurde zentrifugiert und die überstehende klare Schicht wurde sogleich verwendet, während der Bodensatz nachdem in 11 ccm Wasser aufgeschwemmt zum Versuch gebraucht wurde. Versuchsdauer 4 Stunden.

<i>M</i> /100 Substratlösung	5.0 ccm
Puffer	5.0 ccm
Ferment	5.0 ccm
Wasser	5.0 ccm

α -Glycerophosphat		β -Glycerophosphat		Ferment
P-mg	%	P-mg	%	
0.0238	30.75	0.0162	20.0	Erythrocyten Dialysat.
0.0174	22.5	0.0127	16.3	Zentrifugat.
0.0113	14.6	0.0149	19.3	Bodensatzsuspension.

Versuch XIV.

Die aus dem defibrinierten Kaninchenblut gewonnenen Erythrocyten wurde mit gleichem Volumen Wasser hämolysiert. Der durch Zusatz von 3 fachem Volumen Aceton entstandene Niederschlag wurde weiter mit 3 fachem Volumen Aceton, dann mit Aceton: Äther (1:1) und schliesslich mit Äther gewaschen. 0.2 g Pulver wurde in 6 ccm Wasser suspendiert und zum Versuch gebraucht. Andererseits wurde 0.4 g Pulver mit 20 ccm Wasser kurz digeriert, zentrifugiert, der Bodensatz mit 20 ccm Wasser umgerührt, der endlich abgeschleuderte Bodensatz in 6 ccm Wasser suspendiert. Hydrolysenversuch bei $\text{pH } 6$, Dauer 2 Stunden.

M/100 Substrat	3.0 ccm
Puffer	6.0 ccm
Ferment	6.0 ccm

α -Glycerophosphat		β -Glycerophosphat		
P-mg	%	P-mg	%	
0.015	24.3	0.0091	14.5	Erythrocyten Pulver.
0.0044	7.3	0.0046	7.5	Das 2 Mal gewaschene Pulver.

Versuch XV.

Hydrolyse des α - und β -Glycerophosphats durch Ebiosphosphatase. Versuchsdauer 2 Stunden.

M/100 Substrat	3.0 ccm
Puffer	6.0 ccm
Ferment	2.0 ccm
M/100 MgCl_2	3.0 ccm
Wasser	1.0 ccm

pH	α -Glycerophosphat		β -Glycerophosphat	
	P-mg	%	P-mg	%
2.2	0.0016	2.6	0.00156	2.5
3.4	0.0034	5.5	0.0023	3.8
3.9	0.0053	8.6	0.0048	7.8
5.0	0.0225	36.4	0.0126	20.3
6.0	0.0446	72.1	0.0302	48.6
7.2	0.042	67.8	0.0320	52.6
8.0	0.027	43.5	0.0231	37.2

Versuch XVI.

Vergleichende Hydrolyse des Hexosemonophosphats, α - und β -Glycerophosphats durch Ebios- und Reiskleienphosphatase, welche beide zur gleichen Wirksamkeit auf β -Glycerophosphat verdünnt waren. Versuchsdauer 2 Stunden.

M/100 Substrat	3.0 ccm
Puffer	6.0 ccm
Ferment	2.0 ccm
Wasser	4.0 ccm

Ferment	pH	α -Glycerophosphat		β -Glycerophosphat		Hexosemonophosphat	
		P-mg	%	P-mg	%	P-mg	%
Reiskleien	5.6	0.0059	9.4	0.0068	11.0	0.0049	7.7
Ebios	6.0	0.0132	24.7	0.0066	10.7	0.0074	12.0

Versuch XVII.

1. α -Glycerophosphatdehydrase.

Bei dem Vergleich der Dephosphorierungsgeschwindigkeit des α - und β -Glycerophosphats ist es für die Messung der Zunahme des anorganischen Phosphors vorteilhaft, dass die zu brauchende Dehydrase P-arm ist. Daher wurde nach Alwall (1930) 50 g Kaninchenmuskulatur fein zermahlen, mit Wasser wiederholt ausgewaschen, endlich in 2 fachem Volumen Wasser aufgeschwemmt und diese Suspension wurde als α -Glycerophosphatdehydrase

gebraucht. Auch nach der kürzlich von Green (1936) angegebenen Darstellung wurde der ausgewaschene und weiter zermahlene Muskelbrei durch Musselin koliert, dem Kolat Acetatpuffer (pH 4.6) zugesetzt, der entstandene Niederschlag wurde durch Zentrifugieren gesammelt. Suspension dieses Bodensatzes wurde als Dehydrase zum Versuch gebraucht. Beim Aufbewahren wurde der Bodensatz mit $M/10$ Phosphatpuffer (pH 7.2) in Eisschrank gestellt und vor dem Versuch wurde mit Wasser gewaschen und in Wasser aufgeschwemmt. Der Faktor, der die Dephosphorierung des α -Glycerophosphats bevorzugt, kann, wie erwähnt, aus der Erythrocytenlösung durch Aceton gefällt werden. Daher wurde die fein zermahlene Muskulatur in 2 fachem 1% KCl durch ein Tuch koliert, mit 3 fachem Volumen Aceton versetzt und der Niederschlag mittels Aceton-Äthers getrocknet.

Die untersuchten Dehydrasen zeigten unter Mitwirkung von Erythrocytenphosphatase keine gesteigerte P-Abspaltung aus dem α -Glycerophosphat.

LITERATUR.

- Alwall, N. (1930): Skand. Arch. Physiol., **58**, 65.
Asakawa, K. (1928): J. of Biochem., **10**, 157.
Asakawa, K. (1930): J. of Biochem., **11**, 143.
Green, D. E. (1936): Biochem. J., **30**, 625.
Hori, W. (1932): J. of Biochem., **16**, 433.
Hotta, R. (1934): J. of Biochem., **20**, 343.
Kobayashi, C. (1930): J. of Biochem., **11**, 173.
Kobayashi, C. (1936): J. of Biochem., **24**, 369.
Manaka, C. (1931–1932): J. of Biochem., **14**, 481.
Neuberg, C. und Sabetay, S. (1925): Biochem. Z., **161**, 240.
Reichel, D. und Köhle, H. (1935): Z. f. Physiol. Chem., **236**, 158.
Roche, J. (1931): Biochem. J., **25**, 1724.
Schäffner, A. und Bauer, E. (1934): Z. f. Physiol. Chem., **225**, 245.
Schäffner, A. und Bauer, E. (1935): Z. f. Physiol. Chem., **232**, 66.
Schuchardt, W. (1935): Biochem. Z., **278**, 164.
Uzawa, S. (1932): J. of Biochem., **15**, 1.
Zetzsche, F. und Aeschlimann, F. (1926): Helvetica Chemica Acta., **9**, 708.

印 檢



CONTENTS TO VOLUME 26.

	Page
MIYAZAKI, Masaki. A contribution to the fat metabolism. The second report. Experimental studies on the influence of various kinds of nutrition upon the acetone forming function	1
The third report. Experimental studies on the acetone forming function of the liver damaged with various methods	19
ITZIOKA, Fuyutaroo. Über die proteolytischen Fermente der Pankreasdrüse des Kaninchens. II. Mitteilung: Über die Aktivierung des Sekrettrypsinogens des Kaninchens	37
YOSHIO, Keizo. Über den Einfluss der Ernährung auf die Wirkung des Adrenalins. II. Mitteilung	49
TSURU, Nagao. Über die Vorgänge der Acetonkörperbildung in der Magenwand. II. Mitteilung. Bei Hunger. III. Mitteilung. Kreuzversuch	63
ITZIOKA, Fuyutaroo. Über den Einfluss der Galle auf die Pankreas- und die Dünndarmproteolyse	75
ITZIOKA, Fuyutaroo. Über die proteolytischen Fermente der Pankreasdrüse, deren Ausführungsgänge unterbunden worden sind	81
Leont'ev, I. and K. Markov. Chemical and immunological studies on muscle proteins of some invertebrates	87
MORI, Chuzo. Über die Bedeutung der Schilddrüse bei Urikolyse	97
MORI, Chuzo. Über die Bedeutung der Schilddrüse im Zucker- und Fettstoffwechsel	107
AKASI, Syûzo. Verhalten des Octopins und seiner Isomere gegen Arginase	129
HASHIMOTO, Kikuma. Über Hydrolyse des α - und β -Glycerophosphates	137